

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARATÉRIISATION DU RÔLE DE SCD1 DANS LE PROCESSUS
MÉTASTATIQUE DU CANCER DU SEIN EN LIEN AVEC L'ACTIVITÉ DE
PLD2

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

SIMON LALONDE

SEPTEMBRE 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à débiter mon mémoire en prenant le temps de remercier tous les gens qui m'ont entourés au cours de ces dernières années. Sans votre support, je n'aurais pu accomplir l'une des plus grandes réalisations de mon existence. Je suis spécifiquement reconnaissant de Catherine Mounier et Amine Lounis qui ont cru en mes capacités et m'ont apportés un appui autant au niveau intellectuel qu'interpersonnel tout au long de ma maîtrise. Je ne serais le scientifique que je suis devenu aujourd'hui sans votre grande contribution tout au long de mon développement.

Cependant, la reconnaissance la plus importante dans mon cœur revient à ma conjointe Véronique. Sans ton encouragement et ton apport intellectuel, la réalisation de ce projet de maîtrise aurait été impossible. Merci de m'avoir constamment épaulé toutes ces années et de toujours être restée à mes côtés malgré les nombreuses épreuves à surmonter.

Je tiens également à remercier mes autres directeurs de recherche Dr Éric Rassart et Dr Karl-Frédéric Bergeron et collègues de laboratoire Sabri Rial, Fatma Bouazizi et Frédérique Desmarais qui manifestent quotidiennement une passion « contagieuse » à l'égard de la recherche scientifique. Votre apport intellectuel et émotionnel a été substantiel tout au long de ces années d'études.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|------|
| LISTE DES FIGURES..... | iv |
| RÉSUMÉ | viii |
| INTRODUCTION | 1 |
| CHAPITRE I | |
| CADRE THÉORIQUE DU SUJET | 3 |
| 1.2 Cancer du sein..... | 5 |
| 1.3 Métastases..... | 10 |
| 1.4 Métabolisme, cancer et métastases..... | 17 |
| 1.5 Mécanismes et voies de signalisations d'intérêts | 22 |
| CHAPITRE II | |
| OBJECTIFS | 27 |
| CHAPITRE III | |
| ARTICLE EN PRÉPARATION | 30 |
| CHAPITRE IV | |
| DISCUSSION | 68 |
| CHAPITRE V | |
| CONCLUSION..... | 75 |
| BIBLIOGRAPHIE | 77 |

LISTE DES FIGURES

| Figure | Page |
|---|------|
| 1.1 Schématisation des structures principales du sein (A) et de la glande mammaire (B) (modifié de (Ali et Coombes, 2002))..... | 4 |
| 1.2 Réseaux lymphatiques dans le sein (tiré de (Statistics, 2015))..... | 5 |
| 1.3 Classifications histologiques (A) et moléculaires (B) des types de cancers du sein (modifié de (Malhotra <i>et al.</i> , 2010)) | 9 |
| 1.4 Le processus métastatique (A) et sa spécificité tissulaire (B) (tiré de (Gupta et Massague, 2006))..... | 13 |
| 1.5 La perte des jonctions intercellulaires (A) et la modification du cytosquelette (B) lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (tiré de (Lamouille <i>et al.</i> , 2014))..... | 16 |
| 1.6 Mécanisme de désaturation par SCD1 (tiré de (Paton et Ntambi, 2009)) | 20 |
| 1.7 Schéma de la signalisation mTOR et de son impact crucial sur la cellule (tiré de (Laplane et Sabatini, 2012))..... | 26 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---------------|--|
| <i>4E-BP1</i> | <i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein</i> |
| AGMI | Acides gras mono-insaturés |
| AGS | Acides gras saturés |
| <i>AJCC</i> | <i>American Joint Committee on Cancer</i> |
| <i>AMPK</i> | <i>AMP-activated protein kinase</i> |
| AO | Acide oléique |
| AP | Acide phosphatidique |
| ARNm | Acide ribonucléique messager |
| <i>BRCA</i> | <i>Breast Cancer Gene</i> |
| <i>BSA</i> | <i>Bovine serum albumin</i> |
| CCI | Carcinome canalaire infiltrant |
| CCIS | Carcinome canalaire <i>in situ</i> |
| CDH1 | Cadhérine-1 |
| Cdk4 | Kinase cycline-dépendente 4 |
| <i>cDNA</i> | <i>Complementary DNA</i> |
| CLIS | Carcinome lobulaire <i>in situ</i> |
| CS | Cancer du sein |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| E-cadhérine | Protéine cadhérine épithéliale |
| <i>ECL</i> | <i>Enhanced chemiluminescence</i> |
| <i>eiF4E</i> | <i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i> |
| <i>FBS</i> | <i>Fetal bovine serum</i> |
| <i>HCl</i> | <i>Chloridric acid</i> |
| <i>HER2</i> | <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> |

| | |
|----------------|--|
| <i>HKD</i> | <i>Histidine kinase domain</i> |
| <i>HPRT1</i> | <i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> |
| <i>HRP</i> | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| kDa | KiloDaltons |
| MDA-231-D3H2LN | MDA-MB-231-luc-D3H2LN |
| MEC | Matrice extra-cellulaire |
| MMP | Métalloprotéinases matricielles |
| <i>mTOR</i> | <i>Mecanisitic target of rapamycin</i> |
| <i>mTORC1</i> | <i>mTOR Complex 1</i> |
| <i>mTORC2</i> | <i>mTOR Complex 2</i> |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| <i>MUFA</i> | <i>Monounsaturated fatty acids</i> |
| <i>OA</i> | <i>Oleic acid</i> |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| p70S6K1 | Kinase ribosomique p70 |
| <i>PA</i> | <i>Phosphatidic acid</i> |
| PLD | Phospholipase D |
| RE | Récepteur à l'œstrogène |
| <i>RIPA</i> | <i>Radioimmunoprecipitation assay</i> |
| RP | Récepteur à la progestérone |
| SCD1 | Stéaroyl-CoA Désaturase 1 |
| SCD5 | Stéaroyl-CoA Désaturase 5 |
| SEM | Standard error of the mean |
| Ser | Sérine |
| siRNA | petit ARN interférent |
| siSCD1 | siRNA contre SCD1 |
| <i>SREBP-1</i> | <i>Sterol regulatory element binding protein-1</i> |
| TEM | Transition épithélio-mésenchymateuse |
| <i>TNM</i> | <i>Tumor Node Metastasis classification</i> |

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| Thr | Thréonine |
| <i>TNBC</i> | <i>Triple-negative breast cancer</i> |
| UV | Ultra-violet |
| <i>YB1</i> | <i>Y-box Binding Protein 1</i> |

RÉSUMÉ

Le cancer du sein est une pathologie complexe qui touche les tissus de la glande mammaire. La formation de tumeurs au niveau de cette glande est déclenchée par une combinaison de facteurs environnementaux et génétiques qui induisent une prolifération anarchique des cellules épithéliales des canaux galactophores ou de l'épithélium des lobules. En 2015, environ 24 400 canadiennes ont été diagnostiquées du cancer du sein et 5 000 en mourront. La mortalité associée au cancer est principalement due au développement de métastases, c'est-à-dire l'apparition de lésions tumorales au niveau d'organes qui sont distants du site d'origine de la tumeur primaire. Plusieurs études récentes montrent l'existence d'un lien entre le métabolisme des lipides et le développement des métastases dans le cancer. La stéaroyl-CoA Désaturase-1 (SCD1) est une enzyme qui catalyse la réaction d'insaturation de la chaîne allylique des acides gras et joue une fonction clé dans le métabolisme des lipides. La recherche sur SCD1 semble montrer l'importance de cette protéine autant dans le développement de la tumeur mammaire que dans la progression du processus métastatique. De plus, le produit principal de SCD1, l'acide oléique (AO), est capable d'activer sélectivement la phospholipase D2 (PLD2), une enzyme capable de réguler les mécanismes cellulaires impliqués dans l'agressivité tumorale. Nous émettons l'hypothèse que SCD1 est une protéine importante dans la formation des métastases en potentialisant l'activation de la PLD2 induisant une signalisation mTOR qui contribue au gain du potentiel migratoire et invasif des cellules cancéreuses. Afin d'évaluer cette hypothèse, les répercussions de la modulation de l'expression de SCD1 et de l'activité de la PLD2 sur des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 D3H2LN-luc hautement métastatiques ont été analysées. Nous avons observé une altération des principaux mécanismes cellulaires associés au développement des métastases suite à l'atténuation de l'expression de SCD1 et de l'activité de PLD2 dans ces cellules de carcinomes mammaires. De plus, nous avons mis de l'avant l'impact de l'AO sur la signalisation mTOR par une voie dépendante de l'enzyme PLD2. Cette étude contribue à élucider certains des mécanismes cellulaires clés impliqués dans le développement des métastases du cancer du sein en lien avec le métabolisme lipidique.

MOTS-CLÉS : Cancer du sein, métastases, SCD1, mTOR, signalisation cellulaire

INTRODUCTION

Le cancer du sein (CS) est un adénocarcinome mammaire qui affecte une grande proportion de femmes partout dans le monde. Le développement de tumeur(s) dans les différentes structures de la glande mammaire, principalement au niveau des cellules épithéliales luminales des canaux galactophores, est caractéristique du phénotype de ce cancer (Briskin et O'Malley, 2010; Li *et al.*, 2005; Malhotra *et al.*, 2010). Cette tumeur est formée de cellules qui prolifèrent de façon anarchique au sein de cette glande et qui sont caractérisées par une autosuffisance en signaux de croissance, une insensibilité face aux signaux inhibiteurs de croissance, la possibilité d'échapper à l'apoptose, la capacité de se répliquer indéfiniment, une activation de l'angiogenèse et un potentiel métastatique (Hanahan et Weinberg, 2000). L'obésité, le tabac, le manque d'activité physique et/ou des mutations sur certains proto-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs sont tous des facteurs pouvant accroître le risque d'initiation du CS (Singletary, 2003). Au Canada, le CS est associé à la catégorie de cancers causant le plus de mortalité, soit environ 14% des décès des femmes atteintes de cancer (Statistics, 2015). De nombreux traitements tels la chirurgie, la chimiothérapie et la thérapie hormonale sont disponibles en fonction du type de CS diagnostiqué. Cependant, lorsque ces traitements s'avèrent inefficaces, la récurrence ou le décès des patientes sont fréquents dû à la présence de métastases (Agarwal *et al.*, 2014; Chen, L. *et al.*, 2014). Une étude récente publiée dans le journal *Cell Metabolism* propose l'existence d'un lien entre le métabolisme des lipides et le développement des métastases en utilisant un modèle de xénogreffe pour l'étude du CS (Sounni *et al.*, 2014). Plusieurs groupes de recherche ont observé une expression et une activité plus élevées de la stéaroyl-CoA Désaturase-1 (SCD1), une enzyme clé

du métabolisme lipidique, autant dans les tissus mammaires atteints de tumeur que des lignées de cancer du sein (Ide *et al.*, 2013; Scaglia *et al.*, 2009). SCD1 est une enzyme codée par le gène *SCD* qui catalyse l'introduction d'insaturations lors du processus de synthèse d'acides gras au sein de leur chaîne carbonée. Elle permet la formation d'acides gras mono-insaturés (AGMI) à partir d'acides gras saturés (AGS) (Enoch *et al.*, 1976; Paton et Ntambi, 2009). Notre laboratoire a récemment démontré une corrélation positive entre l'expression de SCD1 et la croissance de cellules MCF-7 et MDA-MB-231, lignées cellulaires issues d'adénocarcinomes mammaires. En effet, l'inhibition de SCD1 dans ces cellules permet de réduire leur prolifération en association avec une diminution des marqueurs oncogéniques de la kinase cycline-dépendante 4 (Cdk4), Cycline D1 et c-Myc (Mauvoisin *et al.*, 2013). À l'opposé, il semble que la surexpression de cette enzyme et les AGMI qu'elle produit jouent non seulement un rôle dans la carcinogenèse, mais également dans le processus métastatique du CS (Angelucci *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2014; Peck *et al.*, 2016). L'altération à la hausse du ratio AGMI/AGS par une activité forte de SCD1 au niveau des tumeurs primaires mammaires de patients atteints du CS diminue drastiquement leur chance de survie et augmente le taux de récidives post-chirurgie (Holder *et al.*, 2013). Finalement, SCD1 semble participer à l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), une étape clé dans l'initiation du processus métastatique, possiblement par l'activation indirecte de la voie Wnt/ β -caténine (Rios-Esteves et Resh, 2013).

CHAPITRE I

CADRE THÉORIQUE DU SUJET

1.1 Structure de l'organe du sein

Chez la femme, le sein est un organe qui couvre la surface corporelle qui est balisée par la clavicule, l'axilla et le sternum. Il contient les glandes lactogènes capables de produire le lait maternel en période d'allaitement qui sera acheminé par les canaux galactophores jusqu'au mamelon (figure 1.1A). Une glande mammaire est formée de 15 à 20 segments ou lobes qui sont drainés par les canaux lactifères qui débouchent au mamelon. Chacun des lobes est composé de 20 à 40 plus petites unités appelées lobules, elles-mêmes constituées de 10 à 100 alvéoles drainées par des conduits intra-lobulaires. C'est l'ensemble des ramifications alvéotubulaires qui confère au sein sa fonction exocrine (Sabel, 2009). La portion luminale des alvéoles et des tubules est tapissée de cellules épithéliales, mais la production et l'accumulation de lait a lieu seulement au niveau alvéolaire suite à des stimulations par l'hormone de croissance et la prolactine pendant la grossesse et l'allaitement (Briskin et O'Malley, 2010). Cet épithélium luminal est enveloppé d'une couche de cellules myoépithéliales (figure 1.1B) pouvant se contracter en présence d'ocytocine afin d'éjecter le lait dans les canaux galactophores (Macias et Hinck, 2012). Le maintien de la structure de la glande mammaire qui est enveloppée de stroma, composé majoritairement de tissus adipeux et de fibroblastes, est assuré par la matrice extra-cellulaire (MEC) formée par une membrane basale et du tissu conjonctif. De plus, l'ensemble du sein est

fortement vascularisé et irrigué par un nombre important de vaisseaux lymphatiques (Watson et Khaled, 2008) (figure 1.2).

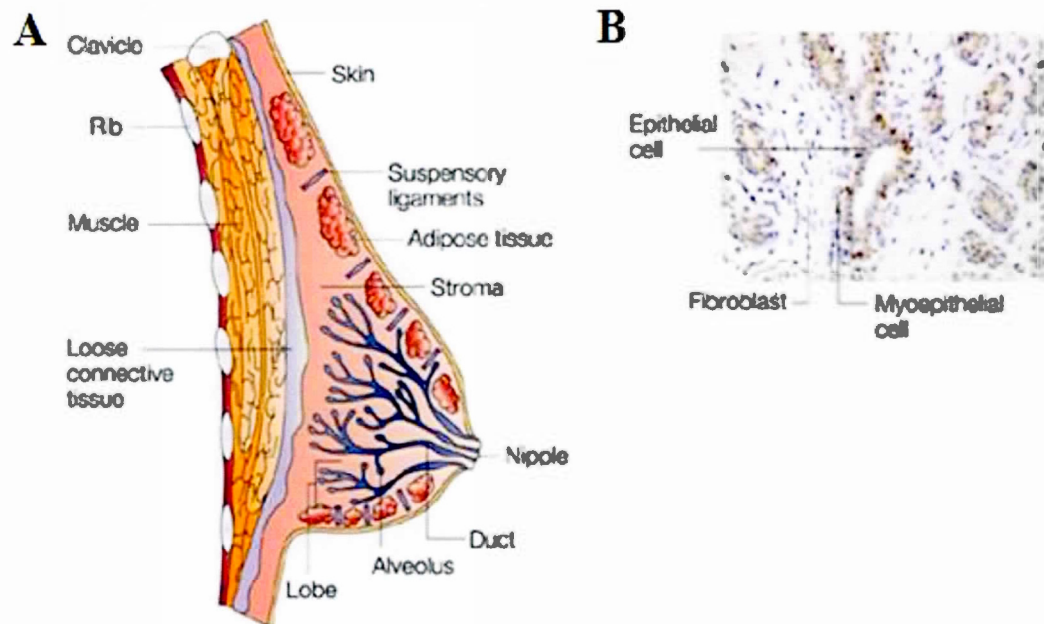


Figure 1.1 Schématisation des structures principales du sein (A) et de la glande mammaire (B) (modifié de (Ali et Coombes, 2002))

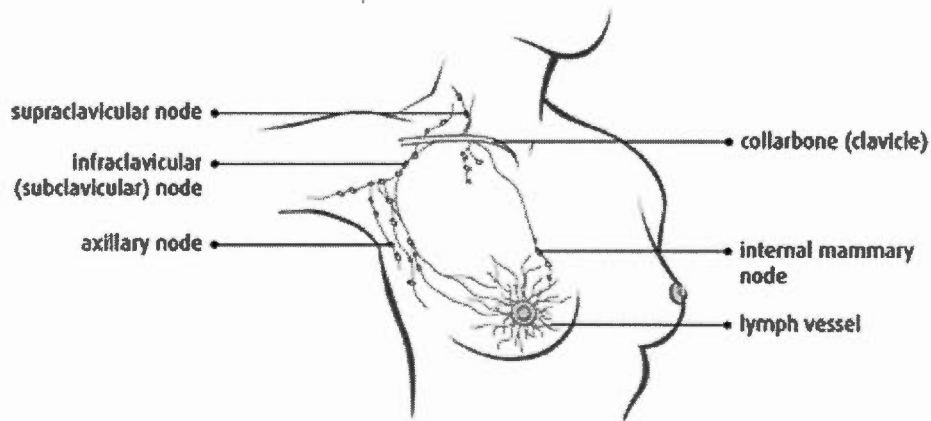


Figure 1.2 Réseaux lymphatiques dans le sein (tiré de (Statistics, 2015))

1.2 Cancer du sein

1.2.1 Cancers

Le cancer est une pathologie qui décrit une prolifération cellulaire anarchique conduisant à la formation de tumeurs à l'intérieur d'un tissu et pouvant en envahir d'autres. Une tumeur bénigne peut menacer la fonction et la survie de l'organe atteint, mais n'est pas considérée cancéreuse si elle reste localisée à l'endroit de croissance initiale. La tumeur maligne est cancéreuse car certaines cellules peuvent migrer vers des organes distants afin de les coloniser et former ainsi de nouvelles tumeurs. Il existe plusieurs mécanismes moléculaires responsables du processus de carcinogénèse, soit de la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse (Pecorino, 2012). En effet, l'Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer a défini une liste d'agents dits cancérogènes de groupe 1, comme certains produits chimiques, irradiations ionisantes, rayons UV ou virus, qui vont mener à la

formation de cancers chez l'humain après exposition aigue ou chronique (Cogliano *et al.*, 2011). De plus, certains gènes transmis de façon héréditaire peuvent également induire une carcinogénèse (Ellis, 2010). Somme toute, ces facteurs vont moduler certains mécanismes épigénétiques, induire des dommages à l'ADN et/ou altérer les mécanismes de réparation de celui-ci ce qui mènera à l'accumulation de mutations au sein du génome de la cellule. Des expériences de transformation cellulaire ont permis d'identifier l'implication des oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs dans la carcinogénèse. Des mutations au sein de ces gènes peuvent altérer la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et les mécanismes de réparation de l'ADN de la cellule normale ce qui mène à l'initiation du cancer (Chow, 2010). Après la croissance des cellules initiatrices, une transformation subséquente menant au gain d'un potentiel invasif et migratoire détermine le potentiel métastatique du cancer (Yokota, 2000). Ainsi, Hanahan et Weinberg (Hanahan et Weinberg, 2000) ont mis en évidence les transformations moléculaires qui définissent les cellules cancéreuses. En effet, l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité face aux signaux inhibiteurs de la croissance, la capacité à s'échapper de l'apoptose, la possibilité de se répliquer indéfiniment, l'activation de l'angiogenèse et la capacité à former des métastases sont caractéristiques des cellules tumorales. La nomenclature indique qu'un cancer qui se forme à partir de cellules épithéliales comme la peau ou les muqueuses est appelé un carcinome. Un cancer qui origine dans le tissu conjonctif comme les muscles ou les os est nommé sarcome. Un adénocarcinome est un cancer qui se développe dans un épithélium glandulaire comme la glande mammaire (Pecorino, 2012).

1.2.2 Cancer du sein : définition

Le CS est l'une des pathologies des plus dévastatrices de la période contemporaine. En 2014, environ 234 190 nouveaux cas de cancers du sein ont été diagnostiqués aux États-Unis et 40 290 femmes ont succombé à la maladie (Society, 2015). Plusieurs

classifications des différents cancers du sein existent et sont assez complexes car elles prennent en compte l'histopathologie, la taille de la tumeur primaire et le niveau de métastase ainsi que le profil des récepteurs et d'autres marqueurs moléculaires. Une revue de littérature publiée en 2010 décrit cette classification selon l'optique histologique qui se base sur les régions des tissus atteints et les patrons de croissance des tumeurs (figure 1.3 A) (Malhotra *et al.*, 2010). Ainsi, il existe 2 types principaux d'adénocarcinomes. La tumeur qui est restée au niveau local et qui ne s'est pas propagée est dite *in situ*. Le carcinome qui ne se trouve plus seulement à son emplacement d'origine et qui a envahi des tissus avoisinants est dit infiltrant. Indépendamment de son agressivité, le cancer qui se développe dans les cellules épithéliales lumenales des canaux galactophores est nommé carcinome canalaire, tandis que celui qui prolifère au niveau des lobules est appelé carcinome lobulaire. Le carcinome canalaire *in situ* (CCIS) est plus couramment diagnostiqué que le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS) (Malhotra *et al.*, 2010). Parmi les tumeurs dites métastatiques, le carcinome canalaire infiltrant (CCI) correspond à plus de 70 % des cas (Li *et al.*, 2005).

Hanahan et Weinberg (Hanahan et Weinberg, 2000) proposent également un modèle de classification en fonction des différents marqueurs moléculaires impliqués dans cet adénocarcinome (figure 1.3 B). Une première identification est faite selon que l'expression est soit abondante, faible ou qu'il y ait absence de certains récepteurs. Le récepteur à l'œstrogène (RE), présent à la surface de la membrane plasmique, peut être impliqué dans le processus de carcinogénèse. En effet, certains CS sont dits positifs pour le RE parce que l'épithélium cancéreux surexprime ce dernier. Un phénomène similaire est observé pour le récepteur à la progestérone (RP). Ces adénocarcinomes peuvent être facilement traités par des antagonistes du RE ou du RP lorsqu'ils sont découverts à un stade précoce (Rakha *et al.*, 2010). Le proto-oncogène *ERBB2* qui code pour le *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2), une protéine de la famille des récepteurs tyrosine kinase HER, est également considéré

comme un marqueur important du CS (Cooke *et al.*, 2001). L'activation de la voie de signalisation de HER2 induit une prolifération cellulaire et une inhibition de l'apoptose. Une surexpression de cette protéine, situation qui se produit dans 20 à 30 % des cas de CS, est généralement associée à un mauvais pronostic malgré la présence de traitements avec un inhibiteur de HER2 (Mitri *et al.*, 2012) . La tumeur mammaire qui ne présente aucun ou un faible taux de ces 3 molécules est un CS dit triple négatif ou de type basal. Récemment, la recherche sur le cancer a permis d'identifier plusieurs autres biomarqueurs menant à une meilleure organisation des sous-types d'adénocarcinomes mammaires. L'identification de certains joueurs clés impliqués dans les jonctions serrées intercellulaires, comme les protéines E-Cadherin et Vimentin, a permis de définir la classe d'adénocarcinome *claudin-low*, un CS triple négatif où l'expression de ces gènes est modulée (Malhotra *et al.*, 2010). De plus, il existe une classification *tumor node metastasis* (TNM) faite par l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) qui est utilisée par de nombreux praticiens. Il s'agit d'une échelle qui détermine la gravité du cancer en fonction du type et de la taille de la tumeur primaire, du niveau de colonisation des nodules lymphatiques et de métastases distantes (Edge *et al.*, 2011).

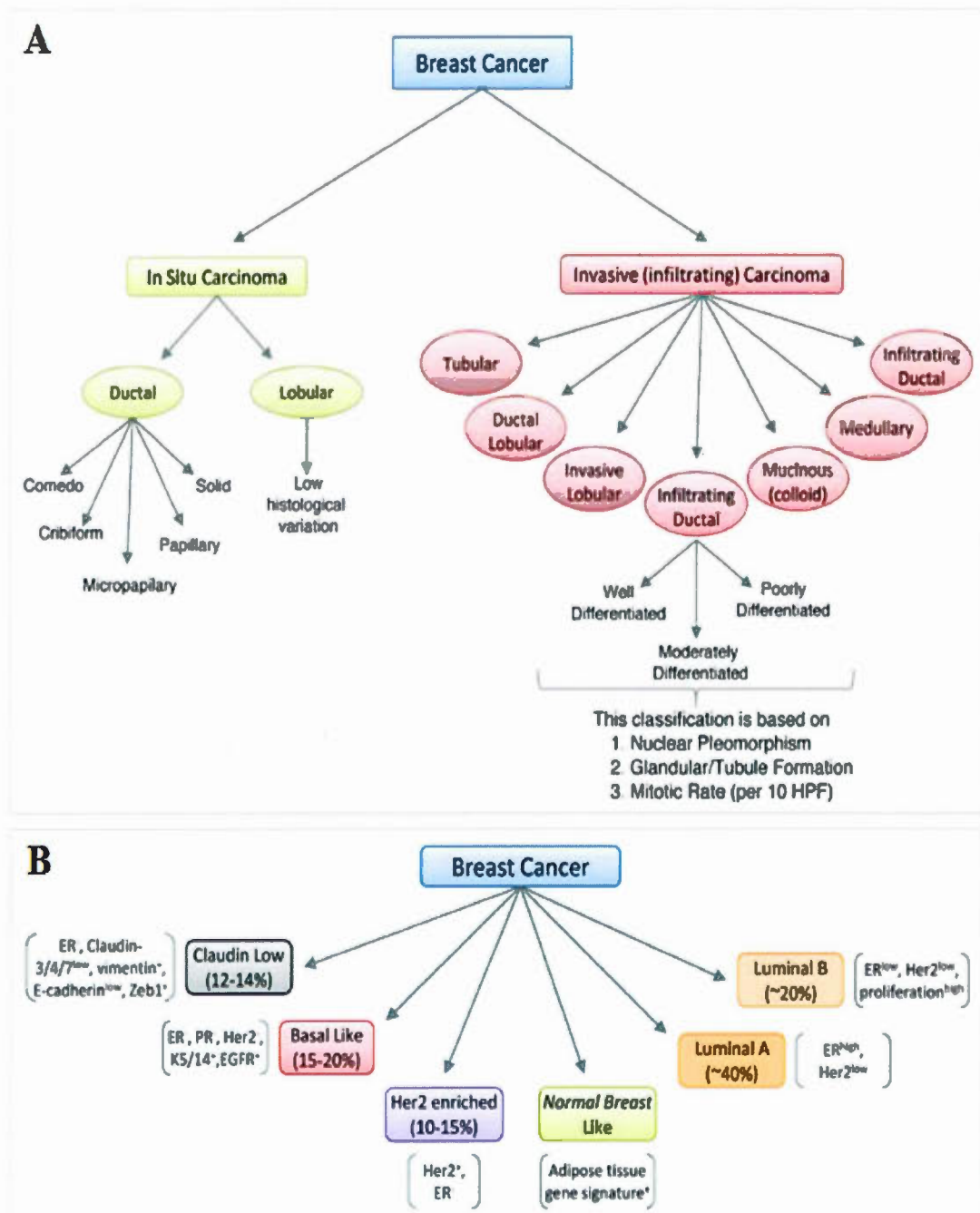


Figure 1.3 Classifications histologiques (A) et moléculaires (B) des types de cancers du sein (modifié de (Malhotra *et al.*, 2010))

1.2.2.1 Cancer du sein : statistiques

Le CS, ou adénocarcinome mammaire, est une pathologie qui touche un grand nombre de femmes partout dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le CS correspondait à 25,2% des diagnostics de cancers chez la femme en 2012 (Cancer, 2014). Ce cancer a engendré 458 503 décès dans le monde, soit 13,7% des mortalités associées au cancer chez la femme, ce qui a mené l'OMS à lui attribuer le statut du plus dévastateur des cancers dans un rapport publié en 2008 (Cancer, 2008). Cependant, plusieurs outils de prévention relativement fiables comme le dépistage par mammographie ou l'analyse génétique des gènes *breast cancer (BRCA)* 1 et 2 sont disponibles depuis plusieurs années. La recherche a mené au développement de stratégies de traitements (chirurgies, cocktails d'anticorps, thérapies hormonales et chimiothérapie) qui ont grandement augmenté les chances de survie et diminué les taux de récurrences des patients atteints (Agarwal *et al.*, 2014; Chen, L. *et al.*, 2014)

1.3 Métastases

1.3.1 Métastases : définition

Généralement, le processus d'initiation du cancer commence lorsque le génome d'une cellule est endommagé et que ses mécanismes cellulaires normaux sont dérégulés. La prolifération de la cellule devenue cancéreuse a lieu dans l'organe d'origine de façon anarchique, donnant naissance à une population de cellules cancéreuses hétérogènes. La tumeur cancéreuse est maligne lorsqu'elle acquiert des caractéristiques agressives et invasives. C'est la transformation de la cellule qui lui donne son potentiel métastatique. Le cancer est dit métastatique si celui-ci s'est propagé afin de coloniser

et croître au sein des organes distants du site d'origine du cancer (Pecorino, 2012). Les métastases sont responsables d'environ 90% de la mortalité associée aux patients atteints de tumeurs solides. De plus, dans le cas du cancer du sein, les métastases sont difficiles à détecter. Elles peuvent resurgir plusieurs années après l'ablation de la tumeur primaire et sont associées à un mauvais pronostic de survie (Nguyen et Massague, 2007).

1.3.1.1 Métastases : mécanismes associés

Le développement de métastases est un processus très complexe (figure 1.4 A). L'acquisition d'un potentiel métastatique des tumeurs primaires dépend de quatre prérequis que les cellules métastatiques doivent avoir afin de survivre dans les sites d'implantation distants (Revue dans (Gupta et Massague, 2006)). Premièrement, ces cellules sont capables de former des tumeurs primaires et démontrent les mêmes caractéristiques que les cellules tumorales décrites par Hanahan et Weinberg (Hanahan et Weinberg, 2000). En second lieu, les interactions normales cellule-cellule sont altérées. En effet, les forces d'adhésion intercellulaires *via* les jonctions serrées sont largement diminuées chez la cellule métastatique, notamment par une diminution de l'expression de la protéine de surface E-cadhérine (Cavallaro et Christofori, 2004). La perte de cette protéine de surface fait partie d'un processus de reprogrammation des cellules métastatiques nommée transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM est un processus clé dans l'appropriation des capacités d'extravasation de la cellule cancéreuse par modification de sa morphologie soulignée par l'acquisition de propriétés mésenchymateuses. Troisièmement, les cellules cancéreuses vont développer une certaine motilité afin de pouvoir s'établir dans un site distant. Des changements au niveau de leur cytosquelette (expression de vimentine et N-Cadhérine), des interactions entre cellules et MEC, des mécanismes de protéolyse localisée et un gain de contractilité cellulaire sont des facteurs qui

contribuent à la mobilité des cellules métastatiques (Friedl et Wolf, 2003). Finalement, la survie de la cellule cancéreuse autant dans le site de croissance primaire que dans les environnements distants dépend de sa capacité à échapper aux mécanismes d'apoptose et d'immunité ainsi que de survivre aux conditions difficiles lors du transit extra tissulaire. Ainsi, l'évasion de l'apoptose déclenchée par le détachement de la cellule et l'association aux agrégats de plaquettes sont des processus contribuant au développement des métastases (Nierodzik et Karparkin, 2006). Cet enchainement de processus spécifiques à la cellule cancéreuse métastatique lui permet ultimement de pénétrer et de proliférer au sein d'organes distants par rapport à son origine.

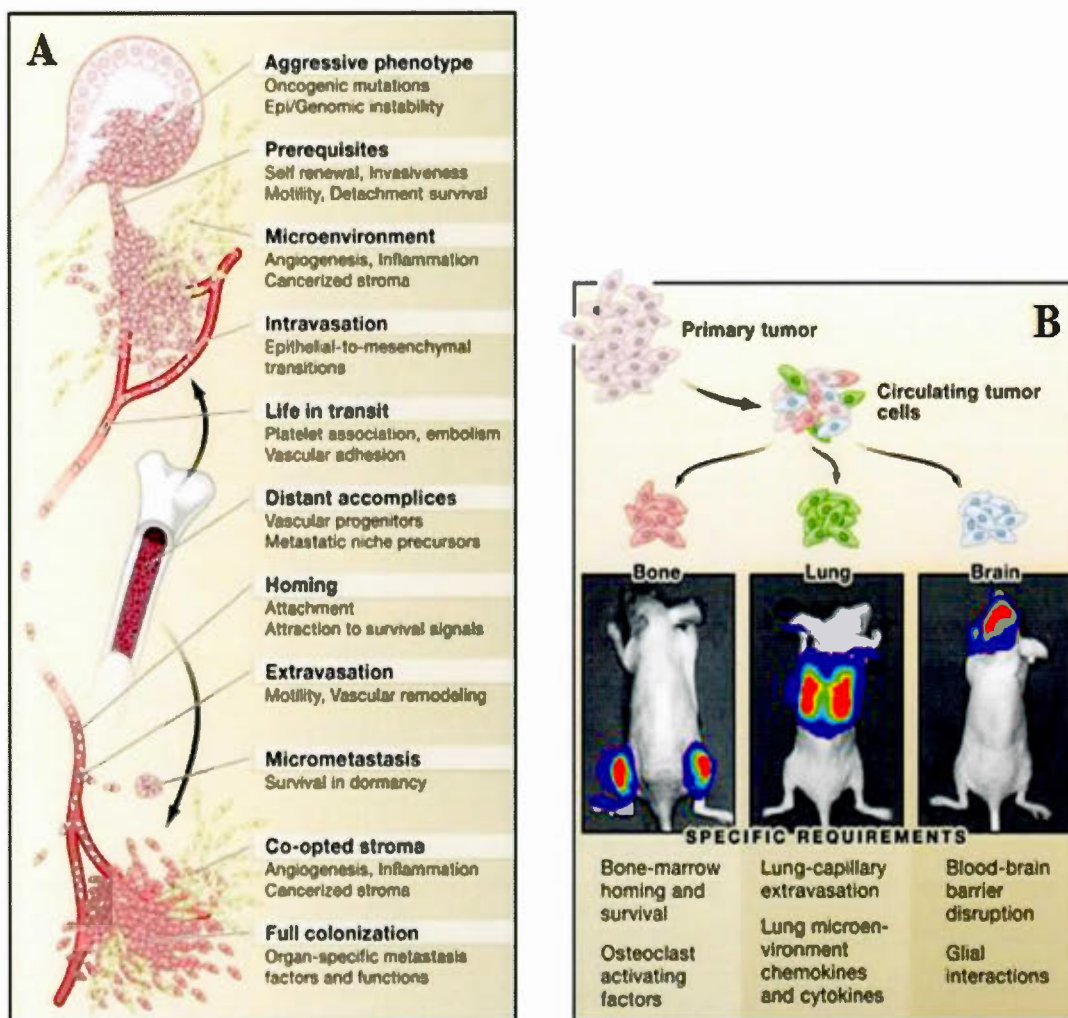


Figure 1.4 Le processus métastatique (A) et sa spécificité tissulaire (B) (tiré de (Gupta et Massague, 2006))

1.3.2 Transition épithélio-mésenchymateuse

Les épithéliums sont constitués de cellules hautement polarisées et liées par différentes jonctions. La polarisation des cellules épithéliales, soulignée par la régionalisation de la membrane plasmique en domaines apical et basolatéral, et leur

forte association intercellulaire sont caractéristiques de leurs fonctions biologiques. En effet, elles agissent en tant que barrière protectrice permettant le transport ou la sécrétion et l'absorption de molécules de façon sélective. À l'opposé, les cellules mésenchymateuses ne possèdent aucune polarité apico-basale et ne forment pas d'épithélium. Ces cellules montrent un niveau d'interaction élevé avec la MEC, phénomène qui leur accorde une forte mobilité (Voulgari et Pintzas, 2009). La TEM est un mécanisme qui décrit la transformation d'une cellule épithéliale vers une cellule avec des propriétés mésenchymateuses (figure 1.5). Le développement embryonnaire, la cicatrisation et le cancer sont tous des processus biologiques où la TEM est impliquée. Ce processus est caractérisé par un inversement de la polarité des cellules épithéliales, une perte de leurs molécules d'adhésion intercellulaires comme la cadhérine épithéliale (E-cadhérine) et une acquisition de propriétés migratoires et invasives (Savagner, 2007). L'activation de la TEM dans les tumeurs malignes est fortement associée à l'initiation du processus métastatique (Thiery, 2002).

L'un des premiers phénomènes observés lors de la TEM est la perte des contacts intercellulaires effectués par les jonctions serrées, adhérentes et communicantes formées par divers complexes protéiques (figure 1.5 A). La perte des jonctions serrées lors de l'initiation de la TEM est associée à une diminution de l'expression de la claudine et de l'occludine, ainsi que de la diffusion de la protéine zonula occludens 1 au niveau des interactions intercellulaires (Huang *et al.*, 2012). La déstabilisation des jonctions adhérentes est principalement liée à la perte d'E-cadhérine sur la membrane plasmique. Cette protéine transmembranaire, codée par le gène *CDH1*, permet l'adhésion mécanique entre les cellules épithéliales. L'association de son domaine intracellulaire avec l'alpha-caténine et la bêta-caténine forme un complexe ternaire qui se lie au cytosquelette de la cellule via la F-actine (van Roy et Berx, 2008). Le clivage d'E-cadhérine peut entraîner une phosphorylation et une accumulation de la β -caténine dans le noyau de la cellule et induire la transcription de gènes impliqués dans la TEM (Peinado *et al.*, 2004). La réorganisation du

cytosquelette d'actine constitue également une étape déterminante de ce processus (figure 1.5 B). La formation de lamellipodes et de filopodes ainsi que la synthèse de fibre de stress par une modification de l'activité des RHO GTPases permettent à la cellule en cours de transformation d'acquérir sa motilité (Lamouille *et al.*, 2014). Les propriétés migratoires de la cellule devenue mésenchymateuse sont conférées par sa capacité à former des invadopodes pouvant relarguer des vésicules de métalloprotéinases matricielles (MMP) capables de dégrader la MEC (Ridley, 2011). La transition vers un phénotype mésenchymateux est un phénomène réversible. Le processus retour de la cellule mésenchymateuse vers une cellule épithéliale polarisée et fixe se nomme transition mésenchymo-épithéliale (Lamouille *et al.*, 2014).

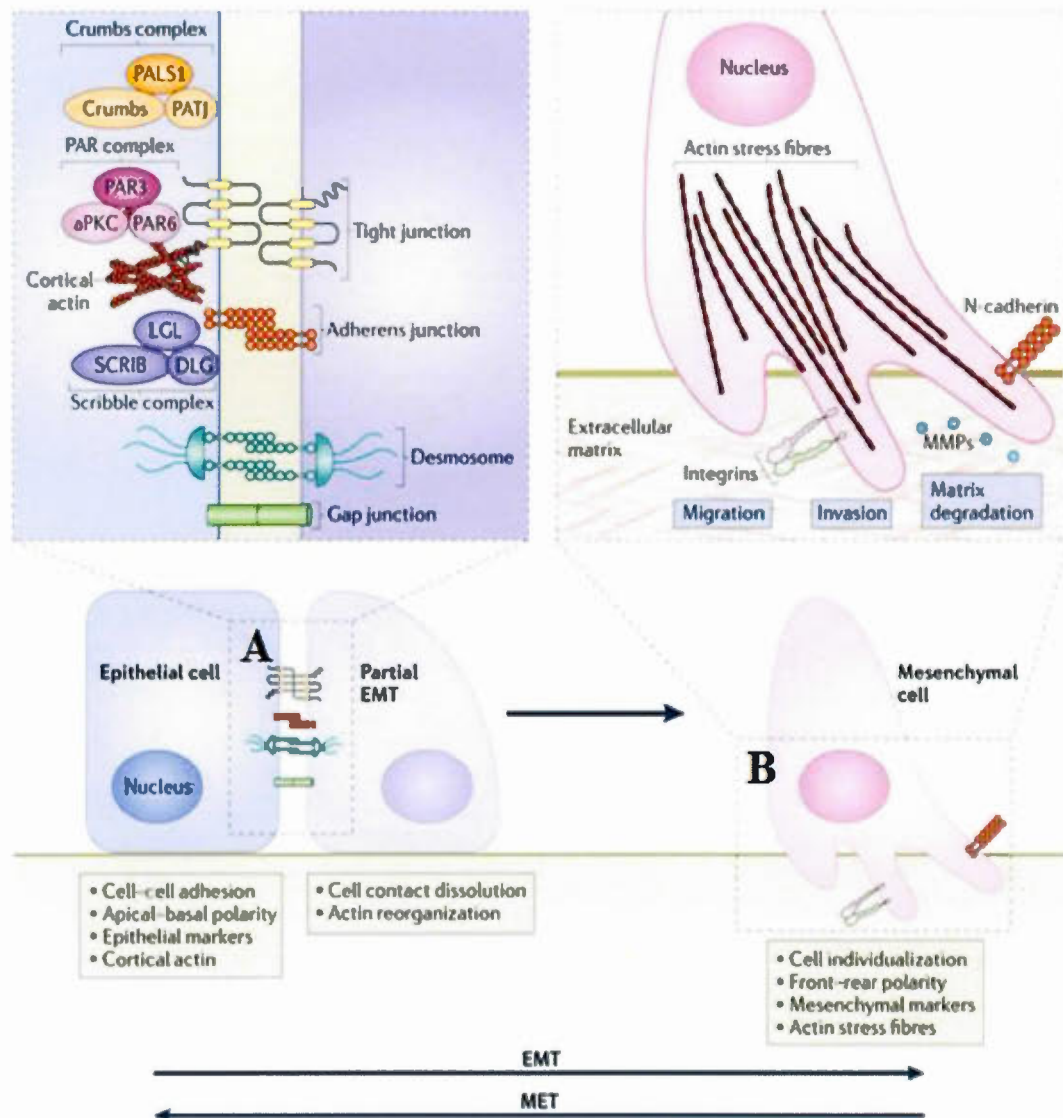


Figure 1.5 La perte des jonctions intercellulaires (A) et la modification du cytosquelette (B) lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (tiré de (Lamouille *et al.*, 2014))

1.4 Métabolisme, cancer et métastases

1.4.1 Métabolisme et cancer : un lien reconnu

Les tumeurs ont besoin d'énergie afin de croître au sein de l'organe touché. Le Dr Warburg a soumis une hypothèse en 1927 basée sur la bifurcation des mécanismes normaux du métabolisme énergétique par les cellules cancéreuses (Warburg *et al.*, 1927). Une cellule normale produit principalement son énergie par l'oxydation du pyruvate, métabolite issue de la glycolyse. En présence d'oxygène, la cellule nécessite peu d'activité glycolytique, mais dépend de la voie de la phosphorylation oxydative du pyruvate dans la mitochondrie pour maintenir son homéostasie énergétique. En revanche, dans les cellules tumorales, un taux de glycolyse surélevé précède systématiquement l'emprunt de la voie de la fermentation lactique indépendamment de la présence en oxygène (Warburg *et al.*, 1927). De façon circonstancielle, les lipides peuvent constituer une autre source d'énergie pour les cellules. Medes et ses collaborateurs (Medes *et al.*, 1953) ont démontré que l'approvisionnement en acides gras des cellules normales se fait à partir des lipides circulants, tandis que les cellules tumorales préconisent la synthèse de lipides *de novo*. Ainsi, les niveaux d'activité des processus lipogéniques et l'expression des enzymes qui y sont associées sont augmentés par rapport aux conditions normales (Swinnen *et al.*, 2006). Les cellules cancéreuses qui prolifèrent abondamment nécessitent un apport élevé en acides gras dans le but de synthétiser les membranes plasmiques des nouvelles cellules et de subvenir à leur besoin énergétique.

1.4.2 Stéaroyl-CoA Désaturase 1

Les stéaroyl-CoA désaturases font partie d'une famille d'enzymes qui catalyse l'introduction d'insaturations lors du processus de synthèse d'acides gras au sein de leur chaîne carbonée. Ces enzymes jouent un rôle clé dans la synthèse de lipides *de novo* ou lipogenèse *de novo* (Paton et Ntambi, 2009). Il existe plusieurs isoformes différents exprimés chez la souris, le rat et l'humain. Chez l'humain, on retrouve principalement SCD1, codé par le gène *SCD* qui est exprimé de façon ubiquitaire ainsi que la stéaroyl-CoA Désaturase 5 (SCD5) essentiellement présente au niveau du cerveau et du pancréas. Cependant, SCD1 est majoritairement exprimé dans les tissus adipeux et le foie (Castro *et al.*, 2011).

Le gène codant pour SCD1 qui se localise sur le chromosome 10 comprend 6 exons au sein d'une séquence de 24 kb. La protéine SCD1 de 37 kDa possède 4 domaines transmembranaires qui traversent la membrane du réticulum endoplasmique. Les extrémités C et N terminales se retrouvent dans la partie cytoplasmique de la cellule et balisent la partie centrale de l'enzyme qui contient 8 résidus histidines importants pour sa fonction enzymatique. En effet, ces régions permettent la liaison d'une molécule de fer non-hémique au sein de la pochette catalytique de l'enzyme (Paton et Ntambi, 2009). Les processus opposés de dégradation et de traduction de SCD1 se déroulent de façon rapide. D'une part, la portion N-terminale de SCD1 d'environ 30 acides aminés de l'enzyme agit comme signal dans son processus de dégradation rapide (Mziaut *et al.*, 2000). D'autre part, plusieurs facteurs comme la diète, les stimulations hormonales et l'environnement peuvent influencer la transcription et la traduction du gène *SCD*. L'activation des voies de signalisation impliquant le *sterol regulatory element binding protein-1* (SREBP-1), les récepteurs nucléaires des oxystérols, les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes et le RE peuvent agir sur le promoteur de SCD1 afin d'activer sa transcription (Bryzgalova *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2006; Kim, Y. C. *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2004).

SCD1 est une enzyme qui catalyse l'introduction d'une liaison double en position 9 dans la chaîne carbonée des acides gras saturés (AGS) afin de synthétiser des acides gras mono-insaturés (AGMI). Précisément, elle contribue à transformer l'acide palmitique (C16 : 0) et l'acide stéarique (C18 : 0) en acide palmitoléique (C16 : 1) et oléique (C18 : 1) respectivement (Enoch *et al.*, 1976). Les AGMI sont les substrats principaux des triglycérides, des esters de cholestérol et des phospholipides, ces derniers étant importants pour la synthèse des membranes plasmiques. Pour effectuer son rôle de désaturase, SCD1 agit de concert avec une NAD(P)-cytochrome b5 réductase et un accepteur d'électrons, le cytochrome b5, en présence d'oxygène afin de catalyser cette réaction aérobie. Le transfert d'électrons entre ces différents joueurs résulte en l'apparition d'une liaison double en position δ -9 de la chaîne aliphatique et la réduction d'O₂ en 2 molécules d'H₂O (figure 1.6). La désaturase agit de manière séquentielle sur les carbones 9 et 10 respectivement en retirant dans cet ordre précis l'atome d'hydrogène lié à chacun des carbones grâce à la portion oxydante sur son noyau ferrique (Paton et Ntambi, 2009). Ainsi, de par son activité oxydante, SCD1 est capable de modifier le ratio entre les AGS et les AGMI.

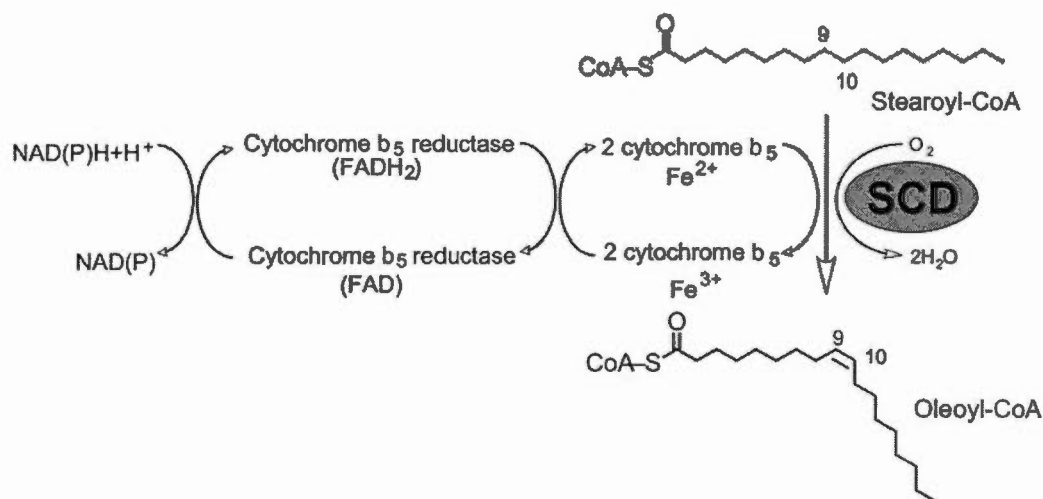


Figure 1.6 Mécanisme de désaturation par SCD1 (tiré de (Paton et Ntambi, 2009))

1.4.2.1 Stéaroyl-CoA Désaturase-1 et cancer du sein

Les enzymes désaturases jouent un rôle clé et même limitant dans le processus de lipogenèse *de novo*. Les AGMI issus de l'activité de désaturation se retrouvent de façon majoritaire dans la composition des membranes lipidiques et des triglycérides. Plusieurs groupes de recherche ont montré l'existence d'une association entre une forte expression de l'isoforme 1 dans les tissus adipeux et le développement de l'obésité chez l'humain (Caron-Jobin *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2009). Sachant que le sein est un organe dont la composition en tissu adipeux est élevée, il semble possible que SCD1 puisse jouer un rôle dans le CS. En effet, des études ont démontré une corrélation entre le ratio d'AGS par rapport aux AGMI dans le sérum et le risque d'être atteint d'un CS (Chajes *et al.*, 2008). Ainsi, la proportion d'AGMI incorporés à la membrane des globules rouges pourrait être utilisée comme biomarqueur important dans le dépistage du CS (Shannon *et al.*, 2007). Une expression et une activité plus élevées de SCD1 sont observées autant dans les tissus mammaires atteints de tumeur

(Ide *et al.*, 2013) que certaines lignées de CS (Scaglia *et al.*, 2009), mais également dans d'autres cancers qui ciblent le foie et les poumons (Scaglia *et al.*, 2005; Yahagi *et al.*, 2005). Notre laboratoire a récemment démontré une corrélation positive entre l'expression de SCD1 et la croissance de cellules MCF-7 et MDA-MB-231, deux lignées cellulaires issues d'adénocarcinomes mammaires (Mauvoisin *et al.*, 2013). En effet, l'inhibition de SCD1 dans ces cellules permet de réduire leur prolifération en association avec une diminution des marqueurs oncogéniques Cdk4, Cycline D1 et c-Myc (Mauvoisin *et al.*, 2013).

1.4.2.2 SCD1 et métastases

La recherche sur SCD1 a permis d'établir un lien entre l'activité de cette désaturase et le développement de certains cancers (Fritz *et al.*, 2010; Mason *et al.*, 2012; Mauvoisin *et al.*, 2013; Scaglia *et al.*, 2005). Il semble que la surexpression de cette enzyme et les AGMI qu'elle produit jouent non seulement un rôle dans la carcinogenèse, mais également dans le processus de progression du cancer. Un taux élevé d'AGMI au niveau des esters de cholestérols est souvent associé à la mort prématurée des patients atteints de cancer en lien avec la présence de métastases (Zureik *et al.*, 1995). L'altération à la hausse du ratio AGMI/AGS par une activité forte de SCD1 au niveau des tumeurs primaires mammaires de patientes atteintes du CS diminuent drastiquement leur chance de survie et le taux de récurrences (Holder *et al.*, 2013). Il a été démontré que l'indice d'insaturation dans les tumeurs du CS est associé principalement à l'activité lipogénique intracellulaire et non à la diète (Simonsen *et al.*, 1998). L'activation du processus d'insaturation des acides gras par SCD1 au sein des cellules épithéliales tumorales est liée à un mauvais pronostic pour les patients souffrants de CS (Petrek *et al.*, 1997). Les recherches effectuées par Zhu et ses collaborateurs (Zhu *et al.*, 1995) démontrent qu'il existe une corrélation positive entre la concentration en AGMI dans les tissus adipeux mammaires et le

niveau d'agressivité des tumeurs de CS. De plus, les lignées de cellules de CS qui montrent un phénotype mésenchymateux possèdent un indice d'insaturation lipidique plus élevé que des lignées qui ne sont pas métastatiques naturellement. Ainsi, la concentration en lipides insaturés semble être un indicateur de l'agressivité des cellules tumorales mammaires (Nieva *et al.*, 2012). Notre laboratoire a précédemment montré l'implication de SCD1 dans le processus d'initiation des métastases dans le cadre d'études *in vitro* sur le CS. Les résultats présentés dans cette publication ont mis de l'avant le rôle primordial de cette désaturase dans l'activation de la TEM des cellules de CS menant au développement des métastases (Mauvoisin *et al.*, 2013)

1.5 Mécanismes et voies de signalisations d'intérêts

1.5.1 Phospholipase D2

La phospholipase D (PLD) est une enzyme qui fait partie de la superfamille des phospholipases. En catalysant la réaction d'hydrolyse de phospholipides, ce type d'enzyme permet de produire des acides gras libres par le relâchement des substances lipophiles qui lui étaient préalablement associées (Xie *et al.*, 2002). Dans le cas de la PLD, elle est capable de générer de l'acide phosphatidique (AP) en brisant la liaison phosphodiester qui retient la phosphatidylcholine grâce à une molécule d'eau qui agit comme nucléophile et aux régions catalytiques HKD constituées des acides aminés histidine, lysine et de l'acide aspartique (Sung *et al.*, 1997). Chez les mammifères, ces phospholipases sont exprimées de façon quasi-ubiquitaire et existent majoritairement sous deux isoformes codés par les gènes *PLD1* et *PLD2*. Les enzymes PLD1 et PLD2 se retrouvent particulièrement au niveau des membranes intracellulaires et plasmiques, possiblement à cause de l'addition d'un radical d'acide palmitique sur certains résidus cystéines (Xie *et al.*, 2002).

L'isoforme PLD2 se localise principalement au sein des radeaux lipidiques qui composent la fraction légère de la membrane plasmique (Xie *et al.*, 2002). L'implication de cette enzyme dans le développement du cancer ainsi que la formation des métastases est due essentiellement par sa production d'AP, un mécanisme amplement détaillé dans la littérature (Fang *et al.*, 2001; Foster, 2009; Gomez-Cambronero, 2014; Peng et Frohman, 2012). Des études *ex vivo* avec les deux isoformes purifiés des PLD ont illustré que l'isoforme PLD2 est spécifiquement activé par l'AO (Kim, J. H. *et al.*, 1999). D'autres ont également démontré un effet similaire de l'AO sur PLD2 en utilisant la lignée de mastocytes RBL-2H3 (Sarri *et al.*, 2003). Arous et ses collaborateurs ont également observé une activation de PLD2 par l'AO dans la lignée cellulaire HepG2 isolée à partir d'un hépato carcinome humain (Arous *et al.*, 2011). De fortes concentrations d'AP, qui se traduisent par une activité élevée d'une PLD oléate-dépendante, sont observées dans les tumeurs mammaires qui sont dites agressives (Uchida *et al.*, 1997). De plus, l'atténuation de l'expression de PLD2 semble diminuer significativement le pouvoir migratoire et invasif de la lignée cellulaire MDA-MB-231 et réduit l'apparition de métastases chez les souris ayant subies des xénogreffes tumorales mammaires (Henkels *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2009).

1.5.2 Voie de signalisation mTOR

La cible mécanistique de la rapamycine (mTOR) est une voie de signalisation complexe qui est impliquée dans une panoplie de processus cellulaire (Laplane et Sabatini, 2012). Son nom a pour origine la découverte de l'effet inhibiteur de la rapamycine, une molécule antifongique premièrement découverte comme métabolite produit par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* (Vezina *et al.*, 1975), sur la

transduction du signal de la voie mTOR (Heitman *et al.*, 1991). mTOR est une sérine/thréonine protéine kinase atypique qui fait partie de la famille d'enzyme des phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui interagit avec une multitude de partenaires protéiques afin de former les complexes mTOR complexe 1 (mTORC1) et 2 (mTORC2) (Laplanche et Sabatini, 2012). Ces complexes possèdent des mécanismes d'activation et des cibles distinctes, résultant en la régulation de fonctions cellulaires diverses par mTORC1 et mTORC2 (figure 1.7). Le complexe 1 peut être activé de façon directe ou non par l'AP, les acides aminés, la signalisation Wnt ou des facteurs de croissance afin de réguler le métabolisme, la synthèse protéique et l'autophagie entre autres, des associations qui sont quasi-unique au complexe 1 (Laplanche et Sabatini, 2009). Généralement, l'étude des effecteurs en aval de mTOR est conduite afin de déterminer les niveaux d'activation des complexes. En effet, l'induction de la synthèse protéique par une activation de mTORC1 est marquée par une cascade de signalisation bien précise. Lorsque le complexe 1 est actif, il induit la phosphorylation du facteur répresseur *Eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E)-*binding protein 1* (4E-BP1) et de la kinase ribosomique p70 (p70S6K1). Sous son état phosphorylé, la protéine 4E-BP1 perd son effet répressif par son incapacité à se lier au eIF4E permettant ce dernier de compléter sa fonction d'initiation de la traduction cap-dépendante (Pause *et al.*, 1994). La phosphorylation de p70S6K1 par mTORC1 révèle une élévation de l'activité de p70S6K1 associée à une augmentation de la synthèse d'ARNm, mais également à des processus d'initiation de la traduction et d'élongation via la régulation de plusieurs autres protéines impliquées dans l'induction des machineries transcriptionnelles et traductionnelles (Ma et Blenis, 2009; Mayer et Grummt, 2006). Une étude a démontré que le niveau de phosphorylation sur le résidu thréonine 389 corrèle fortement avec l'activité kinase de p70S6K1, pouvant ainsi servir d'indicateur de la transduction de signal en aval de mTORC1 (Hannan *et al.*, 2003).

Au fil du temps, une vaste étendue de fonctions contrôlées par mTOR a été caractérisée (Benjamin *et al.*, 2011). La nature des processus qu'il régule, comme la prolifération, la survie et la mobilité cellulaire, a mené à son association avec le cancer et le processus métastatique (Foster, 2009; Hsieh *et al.*, 2012; Laplante et Sabatini, 2012; Zhou et Huang, 2011). Ainsi, l'approfondissement des connaissances depuis les dernières années concernant les mécanismes moléculaires régulant les voies de signalisations impliquant les complexes mTOR est de mise dans le contexte de l'étude du cancer (figure 1.7). Des études ont démontré que l'activation de cette voie de signalisation influence la régulation de la migration et de l'invasion de cellules du CS métastatiques (Wander *et al.*, 2013). D'autres recherches exposent l'importance de cette voie dans le processus métastatique par son influence sur la régulation de la biosynthèse de protéines oncogéniques (Hsieh *et al.*, 2012). De façon prometteuse et intéressante, des molécules ciblant mTOR ont été développées et approuvées lors d'études cliniques afin de contrer les effets pro oncogéniques de mTOR, dévoilant ainsi son potentiel comme cible thérapeutique (Oudard *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2011).

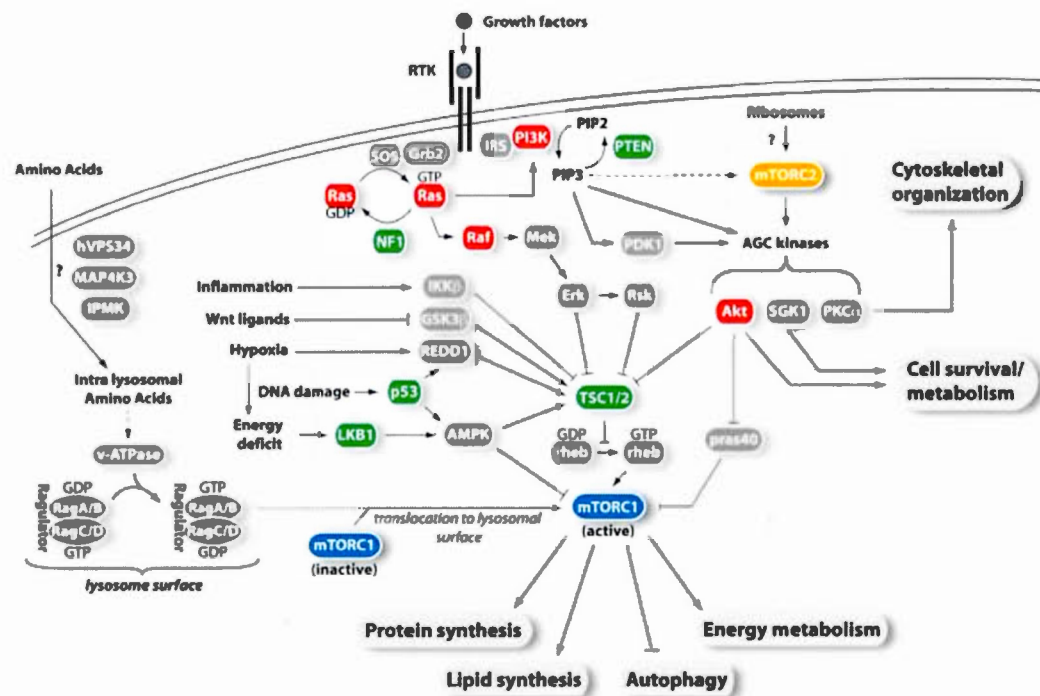


Figure 1.7 Schéma de la signalisation mTOR et de son impact crucial sur la cellule (tiré de (Laplante et Sabatini, 2012))

CHAPITRE II

OBJECTIFS

2.1 Hypothèses et objectifs

SCD1 joue un rôle clé dans la production des AGMI qui sont les principaux substrats des triglycérides, des esters de cholestérols et des phospholipides. Une inhibition de cette enzyme chez la souris protège cette dernière contre la prise de poids tout en montrant des taux de lipides et de cholestérol réduits et une sensibilité accrue à l'insuline (Ntambi *et al.*, 2002). Récemment, certaines équipes de recherche ont montré l'existence d'un lien entre le métabolisme des lipides et le cancer. Une étude publiée dernièrement dans le journal *Cell Metabolism* mentionne l'implication directe de cette voie métabolique dans la résurgence du CS et la formation de métastases (Sounni *et al.*, 2014). Il est reconnu que l'activité de SCD1 est augmentée dans plusieurs types de cellules cancéreuses, incluant les cellules tumorales de la glande mammaire (Scaglia *et al.*, 2009). Notre laboratoire a démontré dans deux lignées de cellules de CS la capacité de SCD1 à moduler les gènes *c-MYC*, *CYCLIN D1* et *CDK4* qui sont tous associés au développement tumoral (Mauvoisin *et al.*, 2013). Ainsi, SCD1 semble être impliquée dans le processus de formation de la tumeur primaire du CS. Le caractère agressif et métastatique de la tumeur peut également être influencé par l'activité désaturase dans la cellule cancéreuse mammaire. Un ratio élevé AGMI/AGS tend vers une augmentation de l'agressivité de la tumeur chez les patients atteints du CS (Zhu *et al.*, 1995). Un fort niveau d'insaturation est

caractéristique de la présence de cellules avec un phénotype mésenchymateux, phénomène associé à un cancer invasif et métastatique (Nieva *et al.*, 2012). Scott et ses collaborateurs (Scott *et al.*, 2009) mettent en évidence l'importance de l'AO, produit par SCD1, dans l'activation de la synthèse d'AP par la PLD2 impliqué dans le chimiotactisme et l'agressivité de cellules de CS. Par ailleurs, SCD1 semble participer à l'activation du processus de TEM, une cible de plusieurs molécules anticancéreuses vu son rôle dans l'induction des métastases (Hatsell *et al.*, 2003; Heerboth *et al.*, 2015; Sheikh *et al.*, 2014).

Bref, sachant que SCD1 est surexprimée dans les cellules cancéreuses des glandes mammaires et qu'une hausse de l'activité de cette enzyme semble être impliquée dans le processus métastatique du cancer, nous cherchons à comprendre d'avantage le rôle de cette désaturase dans le CS. À l'aube de ces connaissances, nous émettons l'hypothèse que l'inhibition de SCD1 et de PLD2 dans des cellules de CS hautement agressives puisse diminuer leur potentiel prolifératif et invasif dans un cadre *in vitro*. Nous anticipons observer un changement au niveau de la morphologie des cellules d'adénocarcinomes mammaires traités avec un petit ARN interférent (siRNA) contre SCD1 et un inhibiteur pharmacologique de PLD2 vers un phénotype moins mésenchymal. De plus, nous croyons que l'altération de ces paramètres à caractère métastatique médié par une activation de la voie mTOR en lien avec SCD1 et PLD2. En effet, nous supposons que l'OA produit par l'activité désaturase de SCD1 servira de substrat pour la production de PA par PLD2, un phospholipide capable d'induire la phosphorylation de mTOR. Bref, cette étude est importante dans le but de mieux concevoir la complicité entre le métabolisme lipidique et l'initiation des métastases afin de déterminer si SCD1 pourrait être la cible d'un traitement contre les métastases du CS.

Ce projet de maîtrise a pour objectifs de :

1. Induire des modifications génétiques temporaires dans des cellules épithéliales MDA-MB-231-D3H2LN-luc de CS hautement métastatique afin de diminuer l'expression de SCD1 et réduire l'activité enzymatique de PLD2 par inhibition pharmacologique
2. Évaluer dans un contexte *in vitro* la prolifération, la migration, la morphologie et le potentiel invasif des cellules traitées avec un siRNA contre SCD1 et/ou un inhibiteur de PLD2.
3. Évaluer l'activation de la voie mTOR par l'AO en présence ou non d'un inhibiteur de PLD2 permettant d'établir l'existence d'un lien entre SCD1 et PLD2
4. Évaluer l'impact de la modulation de l'expression de SCD1 sur l'activation de la voie mTOR.

CHAPITRE III

ARTICLE EN PRÉPARATION

Implication of SCD1 in breast cancer progression through a PLD2-dependent pathway

Lalonde S, Bergeron KF and Mounier C

BioMed Research Center, Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal (UQÀM), Montreal, Canada

Abstract

Encoded by the *SCD1* gene, Stearoyl-CoA Desaturase 1 is an enzyme capable of catalyzing the formation of monounsaturated fatty acids (MUFA). Previous reports of higher expression and increased activity of this desaturase in breast cancer tissues and cell lines prompted us to investigate its involvement in mammary carcinoma. More specifically, *SCD1* expression profile of SCD1 has been correlated with cell proliferation, survival and migration. The MUFA oleic acid (OA) produced by SCD1 can selectively activate phospholipase D2 (PLD2), an enzyme with potential implications in cell migration, invasion and cytoskeleton reorganization. Recently, we demonstrated that transient inhibition of *SCD1* in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells decreased MAP Kinase signal transduction and impaired epithelial to mesenchymal transition-like behaviors, traits associated with metastasis initiation. To determine the contribution of *SCD1* in the acquisition of invasive properties by PLD2 activation, we impaired both SCD1 expression and PLD2 activity in the highly metastatic MDA-MB-231 derived breast cancer cell line MDA-MB-231-D3H2LN-luc (MDA-231-D3H2LN). Cell migration and invasion were diminished when knocking down *SCD1* expression and PLD2 activity concomitantly. Consequently, similar treatment of MDA-231-D3H2LN cells altered their morphology, with cells presenting fewer mesenchymal-like properties. These metastasis-associated processes could be regulated by mTOR, since PLD2 inhibitor treatment completely abrogated the OA-induced mTOR activation, hinting at a PLD2-dependent role for SCD1 in breast cancer metastasis. Our results present evidence of a possible interaction between SCD1 and PLD2 in the progression of breast cancer.

Keywords

SCD1, PLD2, Breast cancer, Metastasis, Cell morphology, mTOR

1. Introduction

The development of breast cancer metastasis is a complex process involving many transformations within malignant cells. Several studies have shown that transition from an epithelial to a mesenchymal phenotype, enhancement of migratory potential in cancer cells, as well as survival and proliferation at the metastatic lesions, contribute greatly to cancer progression (Barkan *et al.*, 2010; Bocca *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2000; Gunasinghe *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2001; Rosenthal *et al.*, 2011).

The heterogeneity in phenotype of breast cancer subtypes can be a challenge for treatment design and prediction of clinical outcome. In most instances, attenuation of breast cancer lethality can be achieved through early diagnosis and pre-emptive treatment of distant site metastasis (Steeg et Theodoreseu, 2008; Weigelt *et al.*, 2005). However, triple-negative breast cancer (TNBC) is more arduous to target with patients displaying shorter survival time after recurrence (Hudis et Gianni, 2011). Interestingly, recent clinical investigations have associated obesity with TNBC (Kwan *et al.*, 2009; Vona-Davis *et al.*, 2008), and revealed body mass index as a risk factor for breast cancer metastasis and distant tumor recurrence (Ewertz *et al.*, 2011; Sestak *et al.*, 2010).

Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1), a key *de novo* lipogenesis enzyme, plays a crucial role in the development of obesity (Dobrzyn et Ntambi, 2004; Ntambi *et al.*, 2002). It catalyzes a desaturation reaction within the aliphatic portion of *de novo* synthesized or diet-obtained saturated fatty acids, forming the mono-unsaturated fatty

acid metabolites palmitoleoyl-CoA and oleoyl-CoA (Paton et Ntambi, 2009). Changes in saturated and monounsaturated fatty acid levels can alter a broad range of cellular mechanisms such as lipid storage, energy metabolism, cell membrane fluidity, inflammation and signal transduction, most of which are implicated in carcinogenesis (Collins *et al.*, 2010; Ntambi *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2009; Tiku *et al.*, 1996; Yonezawa *et al.*, 2008). Many studies have found *SCD1* to be upregulated in primary tumors of several cancer types, such as prostate, kidney, liver and breast cancer (Falvella *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 2010; Ide *et al.*, 2013; von Roemeling *et al.*, 2013). Lipid desaturation activity in serum and tumor of patients has been correlated with a higher risk for breast cancer (Chajes *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2014). More specifically, *SCD1* has been shown to be a driver of cell proliferation and to regulate anti-apoptosis signals, favoring breast cancer cell growth and survival (Mason *et al.*, 2012; Scaglia *et al.*, 2009). The association of *SCD1* with breast cancer has mostly been studied in the context of primary tumor development. However, its role in the metastatic process has also been explored. An elevated *SCD1* expression profile in breast tumors was recently correlated with grade III and invasive ductal carcinomas, traits associated with metastatic potential (Peck *et al.*, 2016). Our laboratory has implicated *SCD1* in the Wnt/ β -Catenin signaling pathway (Mauvoisin *et al.*, 2013), a crucial process in the epithelial to mesenchymal transition (EMT) leading to metastasis (Heerboth *et al.*, 2015). Cancer-associated fibroblasts demonstrated an ability to promote the migration of metastatic breast cancer cells by inducing *SCD1* expression (Angelucci *et al.*, 2015). Overall, these results strongly suggest a role for *SCD1* in metastatic breast cancer progression.

Phosphatidic acid (PA) is a labile signaling lipid synthesized by Phospholipases D (PLD) that can impact a wide variety of cancer-associated cellular mechanisms, including cell survival and proliferation (Fang *et al.*, 2001; Foster, 2009; Peng et

Frohman, 2012). In MDA-MB-231 cells, PA is able to drive cell motility in a PI3K-dependent fashion (Sliva *et al.*, 2000). PA over-production by phospholipase D2 (PLD2) enhances tumor growth and metastasis of breast tumor xenografts in immunodeficient mice (Henkels *et al.*, 2013). The effects of *PLD2* on breast cancer progression seem to result from the activation of the mammalian target of rapamycin (*mTOR*) signaling pathway (Chen, Y. *et al.*, 2003; Foster, 2009). Past investigations have reported a selective activation of PLD2 activity by oleic acid (OA), the main product of SCD1 activity (Kim, J. H. *et al.*, 1999; Sarri *et al.*, 2003). Therefore, the possibility of a conjunct role of *SCD1* and *PLD2* in breast tumorigenesis warrants exploration.

The goal of this investigation is to examine the effects of delta-9 fatty acid desaturation and transphosphatidylase activity of PLD2 in the initiation of breast cancer metastasis. With this intent, our experiments were conducted with triple negative MDA-MB-231-luc-D3H2LN (MDA-231-D3H2LN) breast cancer cells that demonstrate a high metastatic potential (Jenkins *et al.*, 2005). We report that knockdown of *SCD1* expression and PLD2 activity hinder the migratory and invasive capacity of MDA-231-D3H2LN cells, accompanied by a change in morphology. Also, we show that mTOR signalling can be triggered by OA, conceivably through a PLD2-catalyzed process. Overall, our data emphasizes a possible role for *SCD1* and PLD2 in breast cancer metastasis initiation and progression.

2. Materials and Methods

Kaplan-Meier plots

The breast cancer Kaplan-Meier plotter (Gyorffy *et al.*, 2010) (kmplot.com) was used to generate relapse-free (n=3554) and distant metastasis-free (n=1609) survival plots in which patients have been separated in two groups according to the SCD1 expression level (Affymetrix probe ID: 200832_s_at) of their primary tumor. To evaluate differences between groups, statistical analyses using the log-rank test and the proportional hazards model were made. Datasets included in analysis: E-MTAB-365, GSE11121, GSE12093, GSE12276, GSE1456, GSE16391, GSE16446, GSE17705, GSE17907, GSE19615, GSE20194, GSE20271, GSE2034, GSE20685, GSE20711, GSE21653, GSE2603, GSE26971, GSE2990, GSE31448, GSE31519, GSE3494, GSE5327, GSE6532, GSE7390, GSE9195.

Cell culture, transfection procedure and treatments

Highly invasive MDA-MB-231-luc-D3H2LN breast cancer cells (MDA-231-D3H2LN; PerkinElmer, #119369) were grown in complete EMEM media (Wisent, #320-005-CL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 500 U/mL penicillin and 500 µg/mL streptomycin (LT Gibco, #15070063), and maintained in a 5% CO₂ incubator at 37°C. For microscopy analysis, cells were seeded at a density of 2x10³ cells per well in tissue culture treated 8-well µ-Slides (iBidi, #80826). A day after seeding, cells were transfected with 20 nM of either control siRNA (siCTL) (Santa Cruz Biotechnology, #sc-37007) or siRNA against SCD1 (siSCD1) (Ambion, #4390824) using the DharmaFECT 4 transfection reagent (GE Dharmacon, #T-2004-01) for a 24 h period. Following transfection, treatment with 1 µM of the SCD1

inhibitor A939572 (Biofine International, #37062) or 10 μ M of the PLD2 inhibitor VU0285655-1 (Avanti Polar Lipids, #857372) were performed for 4 h using DMSO as vehicle and control. Treatment with oleic acid (Sigma, #O-3008) was performed for 24 h.

Cell proliferation assay

Cell proliferation was evaluated using a MTT formazan (Sigma, #M2003) colorimetric assay. Briefly, cells were seeded at a density of 1.5×10^4 cells per well in 96-well plates in complete media. The next day, cells were treated with DMSO, A939572, VU0285655-1 or a combination of both inhibitors for up to 96 h. At every time point indicated, cells were incubated with fresh media containing 1 mM MTT and transferred in a 5% CO₂ incubator at 37°C for 4 h. The formazan crystals were dissolved in 0.01 M SDS-HCl overnight in a 5% CO₂ incubator at 37°C and absorbance was measured at 570 nm with correction at 690 nm. MTT concentration relative to untreated control cells is indicative of cell proliferation.

Cell cycle analysis

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 1×10^5 cells per well. The next day, cells were treated 48 h with DMSO, A939572, VU0285655-1 or a combination of both inhibitors. After treatment, cells were trypsinized and fixed dropwise with absolute ethanol (70% final). Cells were stained with 50 μ g/mL propidium iodide (PI) (BD Biosciences, #556463) in the presence of 15 μ g/mL RNase A and subsequently incubated 15 minutes at 37°C and overnight at 4°C to reach equilibrium. PI fluorescence was measured using an Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences) and cell cycle analysis was performed with FlowJo software v10.

Colony forming assay

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 1×10^4 cells per well and treated 48 h with DMSO, A939572, VU0285655-1 or a combination of both inhibitors. After treatment, cells were grown in complete media for up to 7 days in a 5% CO₂ incubator at 37°C to allow for large colonies to form. The colonies were fixed in ice cold 100% methanol and stained with 0.2% crystal violet in a methanol-water (25:75) solution. Images (36 fields per condition) were acquired with a Nikon Eclipse Ti inverted microscope using a Plan Apo 4X/0.2 NA objective.

Kinetic wound healing assay

MDA-231-D3H2LN cells were seeded in 24-well plates at a density of 5×10^4 cells per well. The next day, cells were siRNA-transfected and subsequently treated with DMSO or VU0285655-1. The confluent cell monolayer was scratched using a sterile P200 pipette tip, cell debris were washed out and complete media containing VU0285655-1 was replenished. Wound recovery was monitored every 20 minutes for 12 h with a Nikon camera (#DS-FI1). Wound area at each acquisition was measured using NIS-Elements software (Nikon).

Cell migration and invasion assays

MDA-231-D3H2LN cells were seeded in 24-well plates at a density of 5×10^4 cells per well. The next day, cells were siRNA-transfected and subsequently treated with VU0285655-1. Cells were trypsinized and transferred to the top chamber of a non-coated (migration) or Matrigel-coated (invasion) transwell insert with 8 μ m pores (Corning, #3422) in serum-free media containing VU0285655-1. Media

supplemented with 10% FBS was used as a chemoattractant in the bottom part of the chamber. Cell invasion through the Matrigel and migration through the membrane was permitted for 24 h and 6 h respectively. Cells that did not migrate were discarded with a cotton swab. Cells present on the bottom side of the membrane were fixed in 70% ethanol, stained with 0.2% crystal violet in a methanol-water (25:75) solution and counted. Images (4 fields per condition) of the membranes were acquired with a Nikon Eclipse Ti inverted microscope using a Plan Apo 4X/0.2 NA objective.

Immunostaining

Cells were washed with warm PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes at room temperature. Permeabilization ensued with permeabilization buffer (1X PBS, 0,25% Triton X-100) for 10 minutes and then blocked with 1% BSA for 1h. Cells were incubated with a primary antibody targeting SCD1 (1:1000; Abcam, #ab19862) overnight, Alexa-Fluor-647 conjugated secondary antibody (1:2000; Abcam, #ab150115) for 1h, actin-stain 488 phalloidin (Cytoskeleton, #PHDG1-A) for 30 minutes and counterstained with DAPI. Fluorescence in samples was observed with a Nikon A1R confocal microscope using a Plan Apo 60X Oil/1.4 NA objective. Quantification of SCD1 expression and cell morphology parameters was made using NIS-Elements software (Nikon).

Morphology analysis

The F-actin stained perimeter of randomly chosen cells was defined as the region of interest. Cell area (mm^2), relative SCD1 expression (Alexa 647 fluorescence), circularity, elongation, convexity and shapefactor were measured with NIS-Elements software (Nikon). Circularity ranges from 0 to 1, where 1 represents a cell

of perfect circularity. Elongation corresponds to the ratio of the maximum/minimum diameter of an object, where the value score correlates with the flatness of the cell.

Western Blotting

Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.5% Na-deoxycholate; 0.1% SDS; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 50 mM NaF) containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma, #P8340; #P0044). Insoluble cell debris were precipitated by centrifugation and solvated proteins were recovered. Protein concentration was determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad, #5000006). Equal amount of proteins (between 10 and 20 μ g) were separated by electrophoresis on SDS-Page and transferred on PVDF membranes. After a 1h incubation in blocking buffer (1x TBS, 0.1% Tween-20, 5% milk), membranes were probed in blocking buffer containing primary antibodies for SCD1 (1:1000; Abcam, #ab19862), phospho-mTOR Ser2448 (1:1000; Cell Signaling, #2971), phospho-p70S6K Thr389 (1:1000; Cell Signaling, #9205), phospho-Akt Ser473 (1:1000; Cell Signaling, #9271), phospho-GSK-3 α/β Ser21/9 (1:1000; Cell Signaling, #9331) or α -tubulin (1:2000; Cell Signaling, #2144). HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling, #7074) or HRP-conjugated anti-mouse IgG (Cell Signaling, #7076) diluted in blocking buffer (1:2000) was used as secondary antibody for 1 h at room temperature. Signals were revealed using the ECL substrate (Millipore, #WBKLS0100).

RT-PCR

Total RNA was extracted using Trizol reagent (ThermoFisher Scientific, #15596026) and corresponding cDNAs were generated via reverse transcription with SuperScript II Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, #18064014) and Oligo-dT primers

(ThermoScientific, #18418012). QPCR reactions were performed using SYBR Green (ThermoScientific, #A25780) in a LightCycler 480 (Roche). The primers used were: human *Y-box Binding Protein 1 (YB1)* 5'- TCGCCAAAGACAGCCTAGAGA-3' (forward) and 5'-TCTGCGTCGGTAATTGAAGTTG-3' (reverse), human *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)* 5'- CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT-3' (forward) and 5'- AGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA-3' (reverse). *HPRT1* was used as a reference gene for normalization of the data.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). A Student t-test was used to compare two groups at a time. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

***SCD1* expression is associated with poor breast cancer prognosis**

We recently suggested a role for *SCD1* in the EMT process in MDA-MB-231 cells, thereby hinting at a possible role for *SCD1* in breast cancer metastasis (Mauvoisin *et al.*, 2013). Interestingly, analysis of Kaplan-Meier plots shows a better survival rate for breast cancer patients with low *SCD1* expression in their primary tumors. More precisely, elevated *SCD1* levels correlate with lower relapse-free survival rates ($p < 0.0001$) (Fig. 1A) as well as distant metastasis-free survival rates ($p = 0.027$) (Fig. 1B) compared to patients bearing tumors with low *SCD1* expression, further suggesting the importance of this gene in breast cancer progression.

Combined inhibition of SCD1 and PLD2 activity abates breast cancer cell proliferation

We investigated the influence of SCD1 and PLD2 activity on proliferation of MDA-231-D3H2LN breast cancer cells. SCD1 inhibitor and PLD2 inhibitor co-treatment diminishes proliferation after 96 h as measured by the MTT assay (Fig. 2A). Although treatment with either inhibitor by itself tends to reduce colony formation, a 75% decrease relative to control is observed when the two inhibitors are combined (Fig. 2B, C). This reduction in cell growth seems to be caused by an impairment of cell cycle progression. Indeed, combined SCD1 and PLD2 inhibition decreases by 7.6% the population of MDA-231-D3H2LN cells in S phase, coherent with a 6.4% increase of cells in G₀/G₁ (Fig. 2D). Also, treatment with A939572 alone reduces the amount of cells in S phase by 5.7% (Fig. 2D). No significant changes in the G₂/M phase subpopulation are observed in any of the treatments. Overall, these data

indicate that SCD1 inhibition alone can lessen breast cancer cell proliferation with a more potent effect when PLD2 is also inhibited.

Breast cancer cell migration and invasion are impaired by SCD1 and PLD2 inhibition

Next, we evaluated the role of both enzymes in cell migration and invasion, key processes of metastatic development. A kinetic wound-healing assay was performed to monitor the migration of highly metastatic MDA-231-D3H2LN cells treated with a siRNA against *SCD1* (siSCD1) and the PLD2 inhibitor (Fig. 3A, C). These cells show an inferior wound recovery response (0.42 fold compared to the control group; Fig. 3B) when *SCD1* is knocked down (25-50% decrease in protein level; Figs. 4B and 5A) while PLD2 activity is inhibited. Individual diminution of *SCD1* expression and PLD2 activity also has a noteworthy effect on breast cancer cell migration as the wound surface recovered is decreased relative to untreated cells (Fig. 3A-C and Supplemental Video 1). These findings were confirmed with transwell migration chambers assays. Independently, *SCD1* knockdown and PLD2 inhibition slightly lessen migration through a transwell membrane. When combined, these treatments substantially diminish cell migration (0.37 fold compared to control; Fig. 3D, E). An increased effect on cell motility was observed when breast cancer cells were subjected to an invasion assay through matrigel-coated transwell membranes. In the presence of PLD2 inhibitor, siSCD1-transfected cells are less effective in crossing a matrigel-coated transwell membrane (0.72 fold compared to control group; Fig. 3F, G). These results show that *SCD1* expression and PLD2 activity are necessary for the migration and invasion potential of MDA-231-D3H2LN cells, and raise the possibility that co-inhibition of SCD1 and PLD2 interferes with the extracellular matrix degradation inherent to the metastasis process.

SCD1 and PLD2 inhibition affects cell morphology

Cell morphology can be an indicator of cell migration behavior, and thus their metastatic potential (Clark et Vignjevic, 2015). Therefore, the shape of MDA-231-D3H2LN cells was evaluated following *SCD1* knockdown and PLD2 inhibition (Fig. 4A). Modulation of SCD1 expression and PLD2 activity does not affect cell surface area (Fig. 4C). However, knockdown of SCD1 expression or PLD2 activity leads to an increase in breast cancer cell circularity (1.34 and 1.37 fold respectively) and a decrease in their elongation (0.80 and 0.82 fold respectively) compared to control. Combined treatment enhances this effect, driving MDA-231-D3H2LN cells toward a rounder (1.48 fold) and less elongated (0.74 fold) shape relative to controls (Fig. 4D, E). Co-inhibition of SCD1 expression and PLD2 activity diminishes the roughness projected by the cells' cytoskeleton, an effect as measured by an increase in ShapeFactor and convexity (Fig. S1). Transfection with the *SCD1*-targeting siRNA successfully reduces expression of the target protein in MDA-231-D3H2LN cells, as shown by a 25% immunofluorescence signal reduction compared to control siRNA. Surprisingly, PLD2 inhibitor treatment also decreases SCD1 expression, albeit only slightly (Fig. 4B).

Oleic acid is able to trigger mTORC1 signaling through a PLD2-dependent mechanism

We investigated the importance of SCD1 and PLD2 on mTOR activation in MDA-231-D3H2LN cells. Simultaneously knocking down SCD1 expression (about 50% protein level; Fig. 5A) and inhibiting PLD2 activity leads to a 0.52 fold reduction in mTOR Ser2448 phosphorylation compared to control (Fig. 5C). Both PLD2 inhibitor treatment and the siSCD1-PLD2 inhibitor combination significantly reduce phosphorylation of the mTORC1 effector p70 S6 kinase (p70S6K) on Thr389 by 0.43

and 0.69 fold respectively (Fig. 5D). Of note, a reduction in mRNA levels of YB-1, a target gene of mTOR, of 0.35 fold is observed in cells co-treated with siSCD1 and PLD2 inhibitor (Fig. S2). Also, only treatment with a siRNA against SCD1 diminishes Akt phosphorylation on S473 by approximately 0.24 fold compared to control cells (Fig. 5B). To determine if OA, the main product of SCD1 activity, can trigger mTOR signaling in breast cancer cells, MDA-231-D3H2LN cells were stimulated with increasing doses of OA. Incubation with 25 and 50 μ M of OA proved to be the most effective doses, inducing a 1.60 and 1.41 fold response in mTOR phosphorylation respectively and a corresponding 1.63 and 1.41 fold response in p70S6K phosphorylation (Fig. 5E). To determine whether OA's effect on mTOR is due to PLD2 activity, MDA-231-D3H2LN cells are stimulated with the previously established doses of OA in the presence of the PLD2 inhibitor. This inhibitor completely abrogates OA-induced mTOR and p70S6K phosphorylation (Fig. 5F). Overall, our results suggest that SCD1 is able to induce mTOR signalling via PLD2 activity.

4. Discussion

The involvement of *de novo* lipid synthesis in cancer metastasis has been increasingly documented in recent years (Baenke *et al.*, 2013; Mashima *et al.*, 2009; Mounier *et al.*, 2014). Here, we confirm that patients bearing breast tumors with high *SCD1* levels tend to have a poor prognosis compared to patients with low expressing tumors (Fig. 1). A similar interrelationship between *SCD1* expression profile, tumor grade and invasive histological classification was recently described in breast cancer patients (Peck *et al.*, 2016). Although more clinical evidence is needed, we suspect that *SCD1* expression screening of breast tumors could be used to evaluate metastatic potential at an early stage of the disease.

The implication of PLD-synthesized PA in cancer and metastasis is well-documented (Fang *et al.*, 2001; Foster, 2009; Gomez-Cambronero, 2014; Peng et Frohman, 2012). In a recent study, delivery of PLD inhibitors by surgically implanted pumps diminished growth and metastasis of MDA-MB-231 breast tumor xenografts in immunodeficient mice (Henkels *et al.*, 2013). Furthermore, selective silencing of *PLD2* in these breast cancer cells decreased their proliferation, and severely impaired their migration and invasion (Henkels *et al.*, 2013). Since PLD2 can be selectively activated by OA (Kim, J. H. *et al.*, 1999; Sarri *et al.*, 2003), we explored this possible relationship between *SCD1* and *PLD2* in the context of breast cancer. In doing so, we share in the present report evidence supporting our hypothesis that *SCD1* is an important player of breast cancer progression, in association with PLD2 activity. Using the highly metastatic breast cancer cell line MDA-231-D3H2LN, we show that combined inhibition of *SCD1* and *PLD2* greatly reduces cell proliferation, as a possible consequence of cell cycle progression impairment (Fig. 2). A previous study

has shown the deteriorating effects of *SCD1* expression loss on cell proliferation and cell cycle distribution in breast cancer cells *in vitro* (Luyimbazi *et al.*, 2010). Targeted inhibition of *PLD2* in MDA-MB-231 cells also diminished cell proliferation (Chen, Y. *et al.*, 2003). Compared to what has been shown elsewhere, the moderate independent effect of *SCD1* or *PLD2* inhibition on cell proliferation or cell cycle progression we observed (Fig. 2) could be due to higher basal level of enzymatic activity in this specific cell line, a plausible explanation considering their elevated metastatic potential (Jenkins *et al.*, 2005). Diverging drug responses on cell proliferation between disparately aggressive breast cancer cell lines has been previously reported (Chen, A. *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2014). Nonetheless, since *SCD1* and *PLD2* can affect cell proliferation through promotion of AMPK and mTOR phosphorylation respectively (Chen, Y. *et al.*, 2003; Scaglia *et al.*, 2009), it is not surprising that their conjunct inhibition amplifies this effect in an additive way, as underlined by our results (Fig. 2).

Cell migration and invasion are hallmarks of metastasis initiation (van Zijl *et al.*, 2011). As we and others have recently shown, *SCD1* can promote EMT and migration in breast cancer cells, processes associated with metastasis (Angelucci *et al.*, 2015; Mauvoisin *et al.*, 2013). A novel study demonstrated that silencing of *PLD2* in breast cancer cells decreased cell motility *in vitro* and metastatic lesions in xenograft models (Henkels *et al.*, 2013). Here, *PLD2* inhibitor treatment of MDA-231-D3H2LN cells transfected with a siRNA targeting *SCD1* strongly reduced wound recovery response (Fig. 3A-C and Supplemental Video). Wound closure assays are known to be potent indicators of whole cell mass migratory behavior (Rodriguez *et al.*, 2005). As cell proliferation was not excluded in such tests, we challenged cells to a transwell migration assay under similar conditions in order to specifically assess the migration potential of single cells (Justus *et al.*, 2014). Interestingly, combined

inhibition of *SCD1* expression and PLD2 activity further decreased the effect of individual treatment (Fig. 3D, E). Over synthesis of monounsaturated phospholipids by lipid desaturase enzymes alters cell membrane lipid composition, augmenting its fluidity (Spector et Yorek, 1985). Cancer cells with a more fluid membrane have an increased capacity to metastasize (Barz *et al.*, 1985; Taraboletti *et al.*, 1989). Recent findings have implicated the ability of *SCD1* to increase breast cancer cell migration by fluidizing the membrane (Angelucci *et al.*, 2015). Also, PLD activity in MDA-MB-231 breast cancer cells has been shown regulate cell migration through an mTOR dependent mechanism (Zheng *et al.*, 2006). In accordance with the aforementioned evidence, we propose that inhibition of *SCD1* and *PLD2* might impair cell motility of breast cancer cells through an overlapping set of pathways, hence the augmented effect observed with combined inhibitory treatment. Moreover, invasion of Matrigel-coated transwell by cells lacking *SCD1* and treated with PLD2 inhibitor was further reduced compared to migration alone, implying an additional effect on extracellular matrix remodelling (Fig. 3F). The involvement of *PLD2* in driving the degradation of extracellular matrix can be associated with metalloproteinase production or mTOR activation, both induced by PA (Lee *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2006). Therefore, targeting multiple mechanisms implicated in cell motility, a signature process of cancer progression, could lessen the metastatic behavior of breast cancer cells.

We previously demonstrated that *SCD1* is implicated in the transformation of breast cancer cells via a β -catenin dependent-pathway, leading them towards a mesenchymal phenotype (Mauvoisin *et al.*, 2013). Such changes in the morphology of malignant cells are related with their ability to migrate. More specifically, the movement of EMT transformed cells is reminiscent of mesenchymal single-cell migration, a trait linked with tumour-cell detachment and spindle-shaped morphology (Friedl et Wolf, 2003; Krakhmal *et al.*, 2015). We hypothesize that *SCD1* and *PLD2*

could alter cell morphology in metastatic breast cancer cells. In a recent study, the metastatic potential of different cell lines derived from osteosarcomas has been correlated with cell morphology parameters. Compared to low metastatic cell lines, cells with a prominent metastatic behavior displayed a more elongated and less circular phenotype, traits of spindle cell morphology (Lyons *et al.*, 2016). The changes in morphology and metastatic potential of MDA-231-D3H2LN cells that we observed when inhibiting *SCD1* expression and PLD2 activity are coherent with what has been reported in the literature. Considering the ability of MDA-MB-231 cells to undergo EMT and exhibit mesenchymal properties, we suppose the loss of *SCD1* expression and PLD2 activity hinders those metastatic traits, with cells becoming more round, less elongated (Fig. 4) and showing alterations in their cytoskeleton (Fig. S1). Evidence has been put forward that underlined a mandatory role of SCD1 in the secretion of acylated Wnt proteins, a mandatory step in the initiation of EMT by Wnt signaling (Rios-Esteves et Resh, 2013). On the other hand, membrane fluidity alteration by SCD1 and regulation of F-actin cytoskeleton dynamics by PA derived from PLD also supports our hypothesis (Angelucci *et al.*, 2012; Ha et Exton, 1993; Spector et Yorek, 1985). Cell morphology plasticity and tissue invasion are closely associated criteria of metastatic cells (Friedl et Alexander, 2011). The modulation of both parameters by SCD1 and PLD2 bring further evidences for their role in metastasis-related processes. Collectively, our data indicate that defective *SCD1* expression and PLD2 activity within cells can alter their morphology, leading them to adopt a phenotype that is less mesenchymal and thus presumably less aggressive.

Though we did not directly evaluate the effect of *SCD1* knockdown on stearic acid desaturation, knockdown of *SCD1* expression in lung adenocarcinoma cells decreased *de novo* synthesis of OA by approximately 20% (Scaglia et Igal, 2008). Due to the ability of OA to specifically activate the PLD2 isoform (Kim, J. H. *et al.*, 1999; Sarri

et al., 2003), we suspected a possible implication of *SCD1* on PLD2-regulated functions, such as activation of mTOR by PA, regulation of cell survival and modulation cytoskeleton reorganization (Fang *et al.*, 2001; Gomez-Cambronero, 2014; Peng et Frohman, 2012; Zheng *et al.*, 2006). Therefore, we focused on the downstream effectors of mTOR, a major signaling pathway in breast cancer progression that is strongly regulated by PLD2-synthesized PA (Chen, Y. *et al.*, 2003; Foster, 2009). Our results suggest that inhibition of *SCD1* expression and/or PLD2 activity impairs mTOR signaling (Fig. 5C, D). We speculate that MDA-231-D3H2LN cells have an over-activated basal mTOR signal as observed with the 1833, a bone metastasis-prone variant of the MDA-MB-231 cell line. As reported by Wander *et al.*, abrogation of an already elevated mTOR was even more potent to reduce cell migration and invasion of 1833 compared to the parental 231 cells (Wander *et al.*, 2013). The significance of mTOR signaling in metastasis-related processes has been detailed in the past (Hsieh *et al.*, 2012; Zhou et Huang, 2011). Co-treatment with siSCD1 and PLD2 inhibitor induced a significant reduction in YB-1 mRNA levels (Fig. S2), a target gene of mTOR (Lyabin *et al.*, 2012) that can trigger EMT (Evdokimova *et al.*, 2009) and has been considered an early marker of breast cancer metastasis (Gens *et al.*, 2010). Therefore, we provide new insights in the involvement of SCD1 and PLD2 as important players of mTOR signaling in metastasis-related processes. Concerning the effect of OA on mTOR, a discrepancy of evidence exists between normal and cancerous cells. Stimulation of trophoblast cells with OA had no impact on mTOR signaling (Lager *et al.*, 2013). Also, addition of OA to the media of podocytes inhibits palmitate-induced phosphorylation of downstream effectors of mTORC1 (Yasuda *et al.*, 2014). However, OA appears to mTOR signaling in a concentration-dependent fashion in a hepatocarcinoma cell line (Arous *et al.*, 2011). In this regard, we also observed an induction of mTOR and p70S6K phosphorylation with similar doses of OA in a mammary carcinoma cell line, thus confirming the ability of OA to trigger mTOR responses within cancer cells (Fig. 5E). Interestingly, the addition of VU0285655-1 completely abrogated OA-

induced mTOR activation, demonstrating a PLD2-dependent role for SCD1 in breast cancer metastasis (Fig. 5F). This result reflects a connection between SCD1 and PLD2 in controlling mTOR-related phosphorylation events that was unprecedented. Also, SCD1 seems to be able to modulate mTOR via a surrogate mechanism by regulating phosphorylation of Akt on Ser473 independently of PLD2 (Fig. 5D). A similar loss of Ser473 phosphorylation by knocking down SCD1 in human lung adenocarcinoma cells has been reported before (Scaglia et Igal, 2008). On the other hand, loss of Akt phosphorylation could possibly due to a retro-activation loop by SREBP-1 governed by the p70S6 kinase as part of mTOR signaling (Yamauchi *et al.*, 2011). Knowing that Akt impacts many cellular processes implicated in cancer and metastasis autonomously of mTOR (Altomare et Testa, 2005; Stegeman *et al.*, 2012; Yan et Lackner, 2012), we speculate that SCD1's effect on tumorigenesis may come from its multipotent action on such a variety of pathways. Surprisingly, PLD2 inhibitor treatment led to a reduction in SCD1 protein (Fig. 4B and 5A). This result is surprising and should be further investigated as it entertains the possibility of a negative feedback loop motif of PA on SCD1 expression. Overall, these results underline the interaction between SCD1-synthesized OA and PLD2 as a novel relationship capable of inducing mTOR signaling.

In conclusion, the research presented here reveals new insights on the implication of SCD1 and PLD2 in cellular mechanisms underlying breast cancer progression. The blockage of proliferation, migration and invasion by simultaneous SCD1 expression knockdown and PLD2 activity inhibition hints at both enzymes being part of complex molecular pathways regulating metastasis. Although *SCD1* gene disruption and currently available SCD1 inhibitors induce dangerous side effects (Miyazaki *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2013), we believe local modulation of SCD1 activity is a promising therapeutic target in oncology. Though their impact on cancer progression

should be further studied, specific inhibition of SCD1 and PLD2 activity within tumor cells could prove to be an efficient way to lower metastasis incidence and improve patient prognosis.

Acknowledgments

We thank Denis Flipo (UQÀM) for confocal microscopy and flow cytometry guidance, as well as Ji Min Guo (Harvard Medical School, Boston) for advice and tools with survival analysis / Kaplan Meier plots. This work was supported by grants from NSERC and FRQNT.

Figure Legends

Figure 1. SCD1 expression in breast cancer tissue is associated with primary tumor resurgence and metastasis

The breast cancer Kaplan-Meier plotter was used to generate (A) relapse-free survival (RFS) and (B) distant metastasis-free survival (DMFS) plots according to disease outcomes. Breast cancer patients were divided into 2 groups based on the level of SCD1 expression measured by microarray gene expression profiling of their primary tumor (high expression in red; low expression in black). Logrank P-values are shown as $-\log_{10}(\text{P-value})$. Hazard ratios (HR) are calculated with a 95% confidence interval.

Figure 2. Impaired SCD1 and PLD2 activity diminishes cell proliferation of MDA-231-D3H2LN cells

MDA-231-D3H2LN cells were treated with DMSO, SCD1 inhibitor A939572 (1 μM), PLD2 inhibitor VU0285655-1 (10 μM) or a combination of both inhibitors for up to 96 h. (A) To measure cell proliferation, an MTT assay was performed every 24 h. (B) Colonies of MDA-231-D3H2LN were allowed to form in full media following 48 h of inhibitor treatment. Representative images of colonies stained with crystal-violet are shown (C). (D) Cell cycle distribution of cells in G0-G1, S or G2/M phases was determined after 48 h of inhibitor treatment. n = independent experiment count.

Figure 3. SCD1 and PLD2 contribute to cell migration and invasion in an additive way

MDA-231-D3H2LN cells were transfected with a control siRNA (siCTL) or siRNA directed against SCD1 (siSCD1) and treated with DMSO or PLD2 inhibitor VU0285655-1 (10 μ M). A scratch test was done when cells reached confluence. (A) Wound recovery corresponds to the surface ratio relative to the initial wound. (B) Area under the curve (AUC) for wound recovery following each treatment. (C) Representative phase-contrast microscopy images 12 h after initial wound for each treatment. (D) Migration of siRNA-transfected and inhibitor-treated MDA-231-D3H2LN cells through a transwell membrane. (E) Representative light microscopy images of the transwell migration assay. (F) Invasion potential of siRNA-transfected and inhibitor-treated MDA-231-D3H2LN cells through a matrigel-coated transwell membrane. (G) Representative light microscopy images of transwell invasion assay. n = independent experiment count.

Figure 4. Loss of SCD1 and PLD2 activity affects MDA-231-D3H2LN cell morphology

MDA-231-D3H2LN cells were transfected with a control siRNA (siCTL) or siRNA directed against SCD1 (siSCD1) and treated with DMSO or PLD2 inhibitor VU0285655-1 (10 μ M). (A) Representative confocal microscopy images of siRNA-transfected and inhibitor-treated cells to evaluate cell morphology. Visualisation of F-actin (green) and SCD1 (red) was achieved by immunofluorescence while nuclei (blue) were stained with DAPI. (B) SCD1 expression was quantified by scoring its immunofluorescence signal. F-actin immunofluorescence was used to determine (C) cell surface area as well as index of (D) circularity and (E) elongation (n = cell count

per treatment ; 3 independent experiments for SCD1 quantification and 4 independent experiments for cell surface, circularity and elongation quantification).

Figure 5. SCD1 and oleic acid can activate mTOR in a PLD2-dependent manner

Quantification of protein expression by immunoblotting of protein extracts. A representative blot is included for each condition and target protein. **(A-D)** MDA-231-D3H2LN cells were transfected with a control siRNA (siCTL) or siRNA directed against SCD1 (siSCD1) and treated with DMSO or PLD2 inhibitor VU0285655-1 (10 μ M). SCD1 and α -tubulin protein expression, as well as Akt Ser 473 phosphorylation, mTOR Ser 2448 phosphorylation (p-mTOR) and p70-S6 Kinase Thr 389 phosphorylation (p-p70S6K) were evaluated. **(E)** MDA-231-D3H2LN cells were treated for 24h with indicated oleic acid (OA) doses. **(F)** MDA-231-D3H2LN cells were incubated with 25 and 50 μ M OA and co-treated with DMSO or PLD2 inhibitor VU0285655-1 (10 μ M) for the last 4 h. Phosphorylation of mTOR Ser 2448 (p-mTOR) and p70-S6 Kinase Thr 389 (p-p70S6K) was evaluated. n = independent experiment count.

Supplemental material:

Video 1. Scratch test: alteration of cell migration by inhibition of SCD1 and PLD2

MDA-231-D3H2LN cells were transfected with a control siRNA (siCTL) or siRNA directed against SCD1 (siSCD1) and treated with DMSO or PLD2 inhibitor VU0285655-1 (10 μ M). At confluence, a wound was made in the cell monolayer by

scraping it with a pipette tip. Serum-stimulated wound recovery was recorded for 12 h (with images taken every 20 min) in media containing DMSO or PLD2 inhibitor.

Figure S1. Inhibition of SCD1 expression and PLD2 activity diminishes projections of cell cytoskeleton

MDA-231-D3H2LN cells were transfected with a control siRNA (siCTL) or siRNA directed against SCD1 (siSCD1) and treated with DMSO or PLD2 inhibitor VU0285655-1 (10 μ M). F-actin immunofluorescence was used to determine the roughness of cell perimeter as determined by (A) ShapeFactor and (B) convexity. (n = cell count per treatment; 4 independent experiments for ShapeFactor and convexity quantification)

Figure S2. SCD1 knockdown and PLD2 inhibition reduces expression of YB-1

(A) Relative YB-1 mRNA expression in MDA-231-D3H2LN transfected with a control siRNA (siCTL) or siRNA directed against SCD1 (siSCD1) and treated with DMSO or PLD2 inhibitor VU0285655-1 (10 μ M). n = independent experiment count.

Figure 1

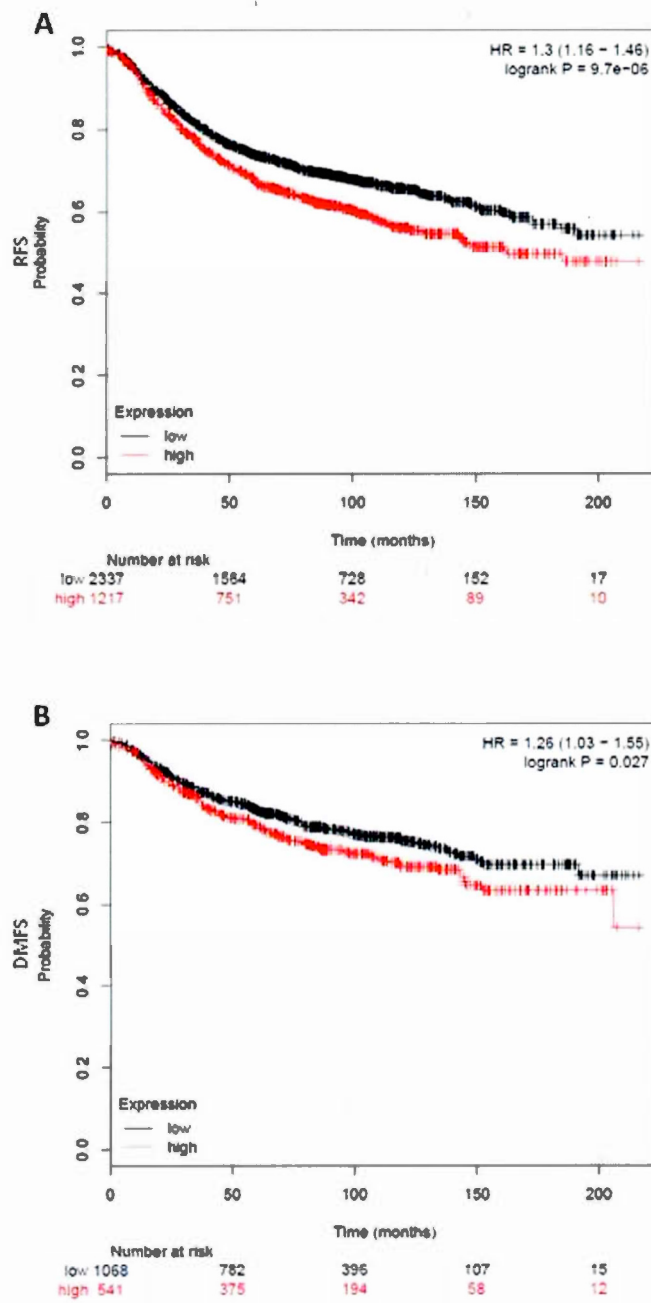
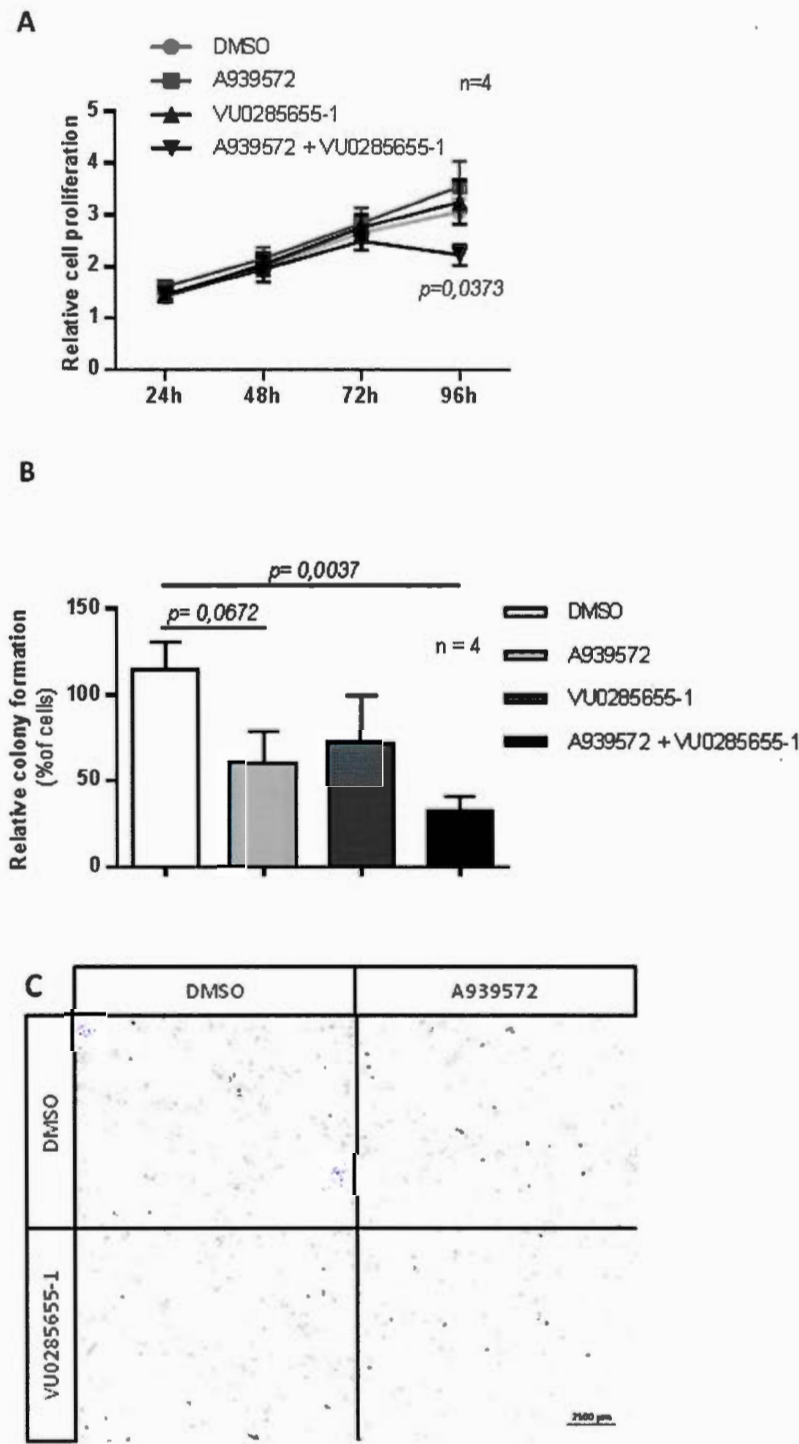


Figure 2



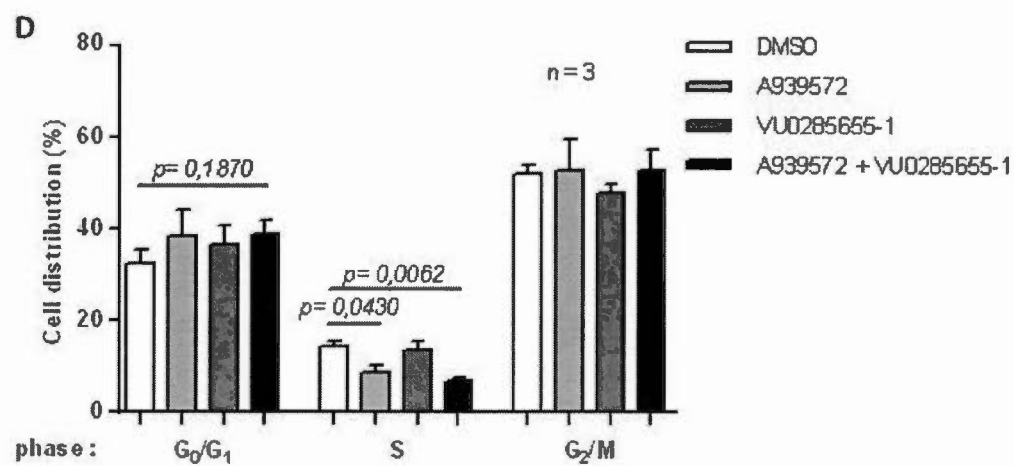
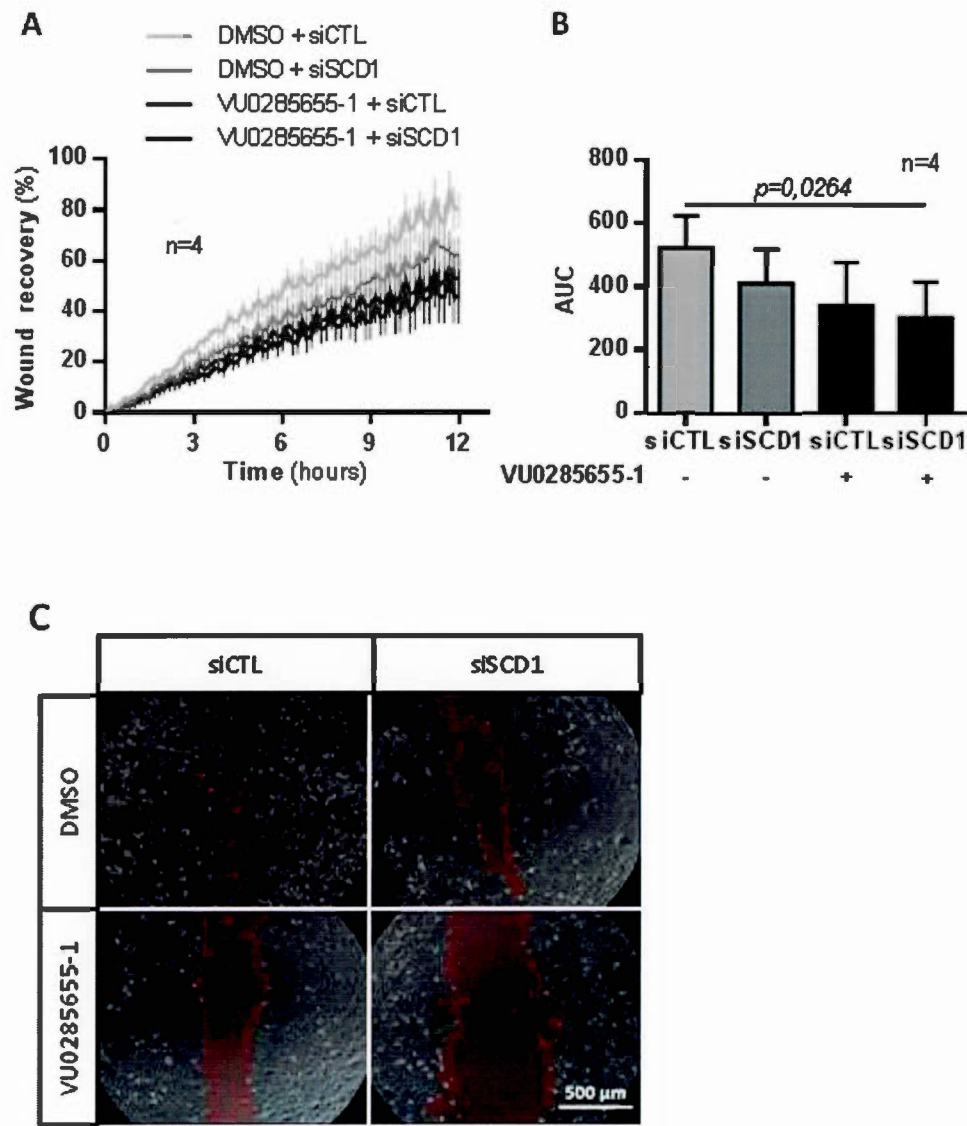


Figure 3



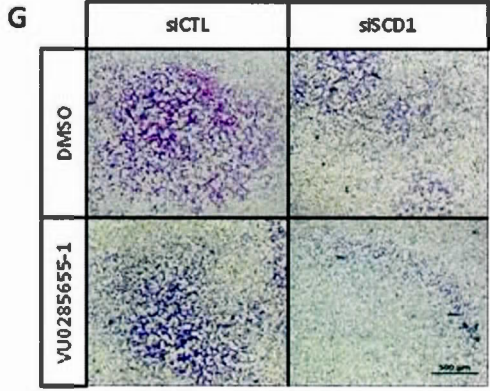
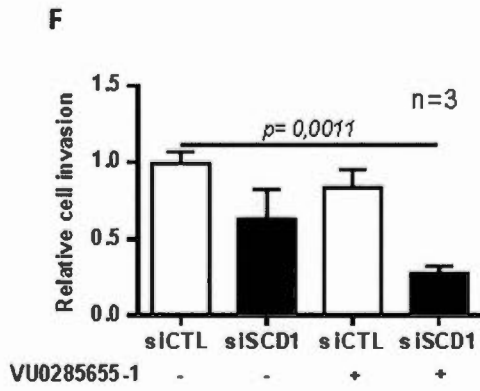
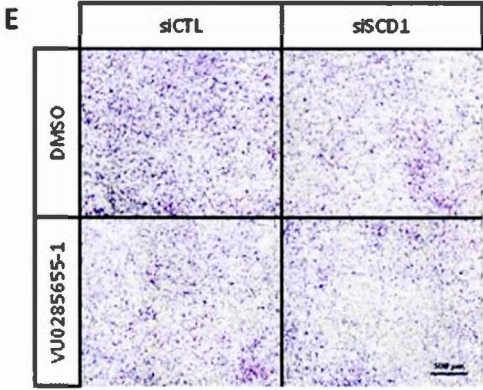
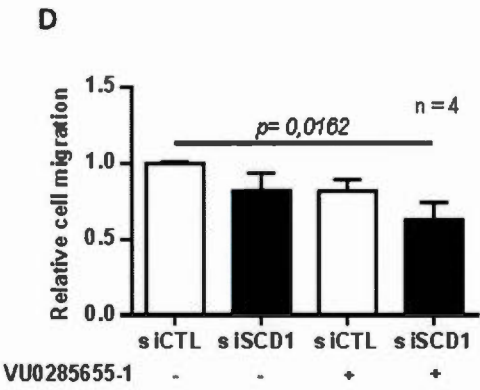
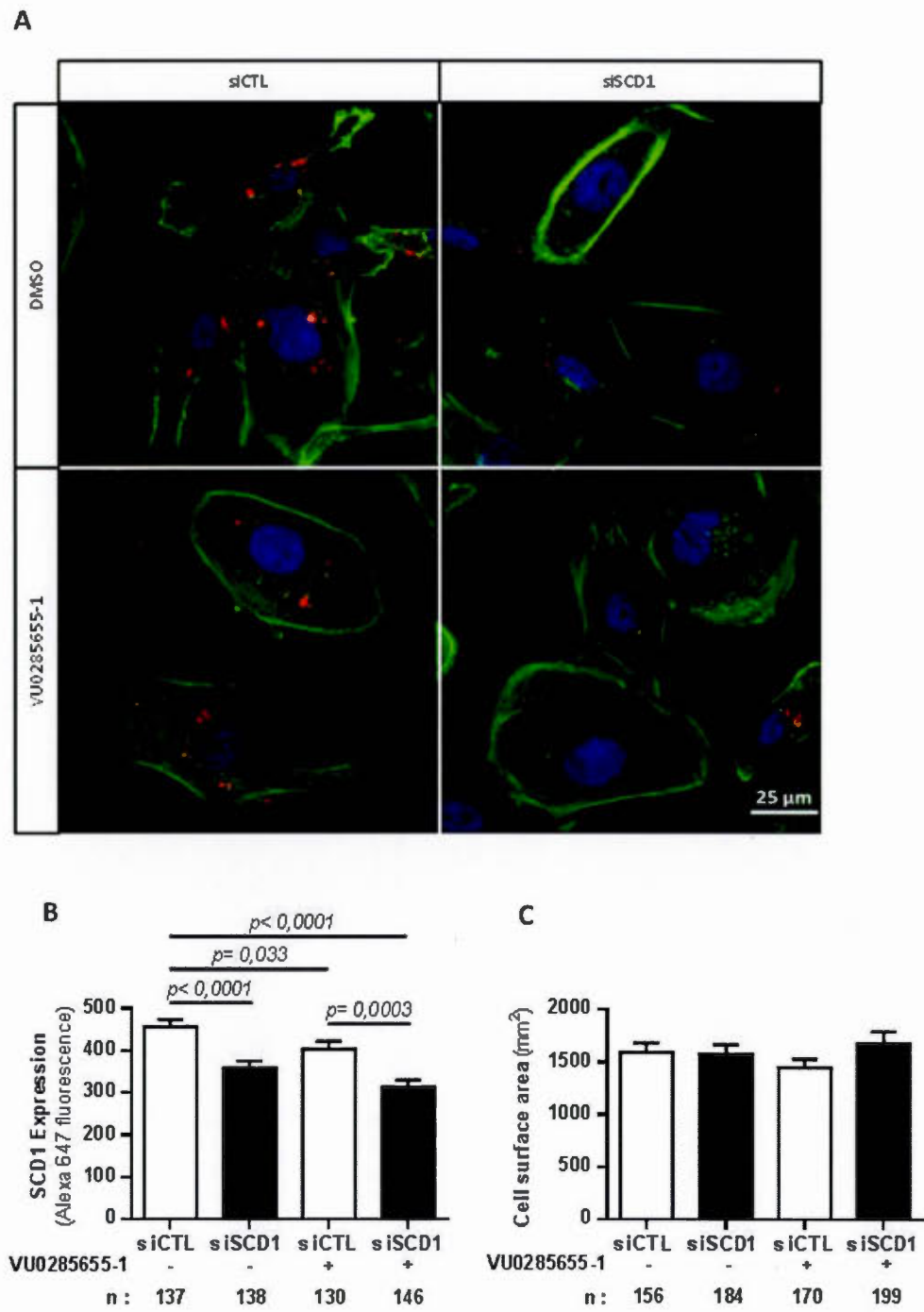


Figure 4



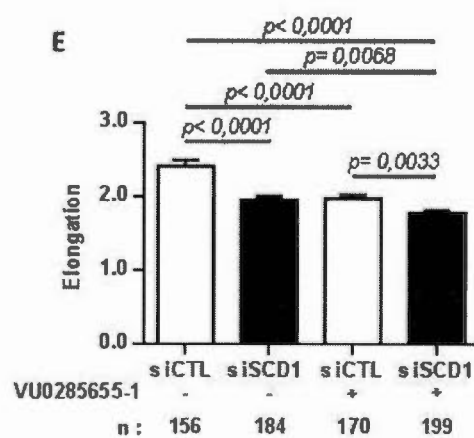
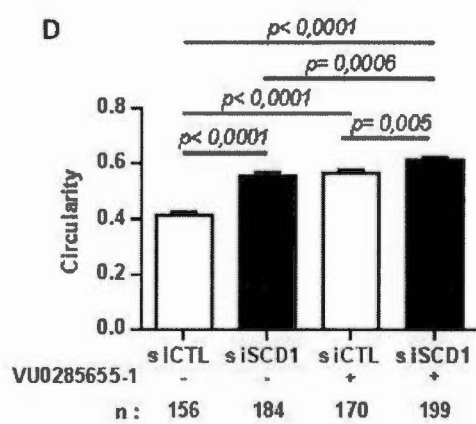
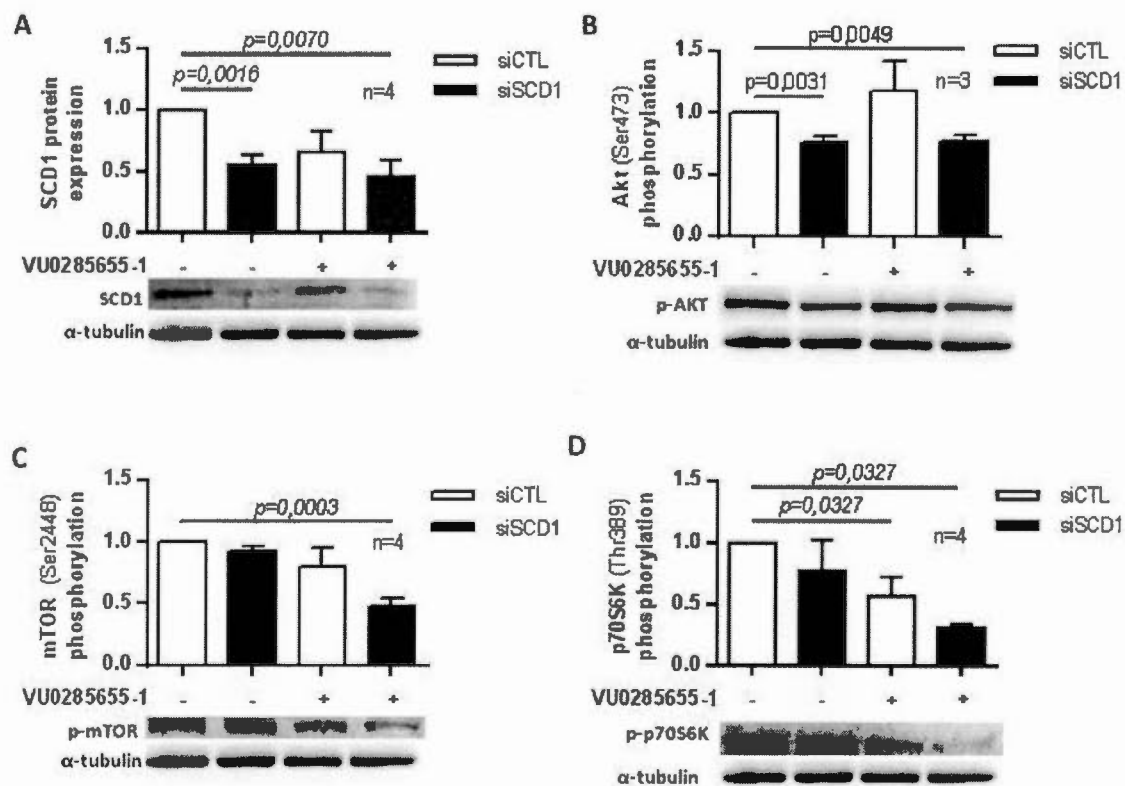
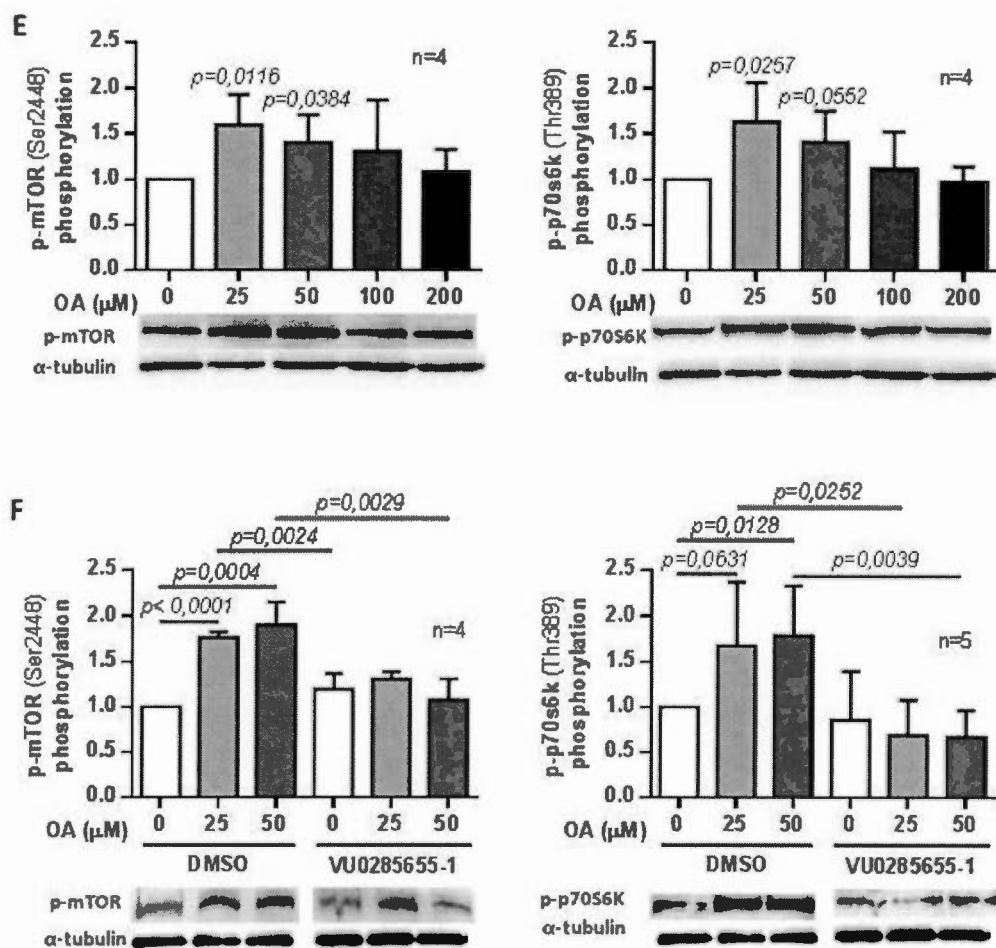
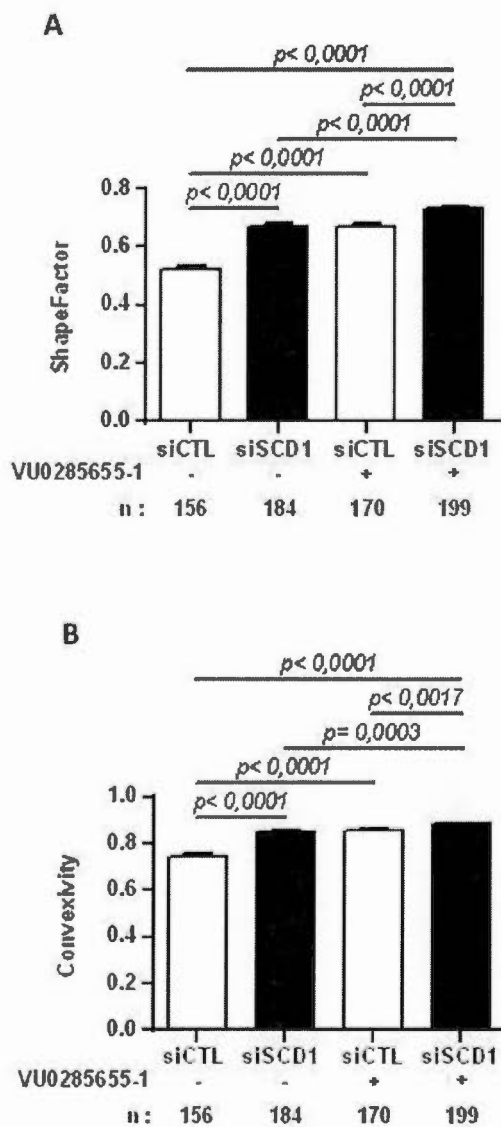


Figure 5

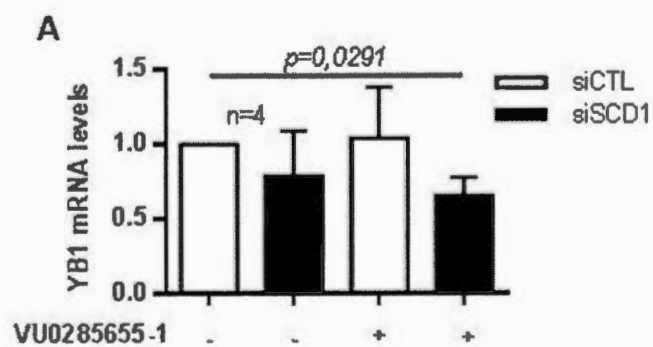




Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les évidences supportant la contribution de la lipogenèse *de novo* dans le développement du cancer métastatique se font de plus en plus nombreuses (Baenke *et al.*, 2013; Mashima *et al.*, 2009; Mounier *et al.*, 2014). Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à cette problématique, il est important de se concentrer sur les marqueurs clés de la lipogenèse, tel que *SCD1*, qui semble être impliqué dans le processus métastatique. Auparavant, notre laboratoire a confirmé l'influence de *SCD1* sur la transformation de différents types de cellules de CS vers un phénotype plus agressif (Mauvoisin *et al.*, 2013). Dans l'étude présente, nous montrons que les patients avec des tumeurs mammaires exprimant fortement le gène *SCD1* sont plus à risques que ceux portant des tumeurs où l'expression de *SCD1* est faible (Fig. 1; Lalonde *et al.*, 2016). Une étude récente a mis de l'avant une relation similaire entre le profil d'expression de *SCD1*, le grade et la classification histologique à partir d'échantillons de patients atteints du CS (Peck *et al.*, 2016). Malgré la nécessité des compléter d'autres études d'ordre clinique, nous suspectons tout de même que *SCD1* pourrait être considéré comme un marqueur prédictif de métastases du CS lors du dépistage chez les patients atteints d'une tumeur primaire.

À ce jour, une littérature expansive existe couvrant le rôle de la biosynthèse d'AP par les PLD dans les processus de cancérogénèse incluant la formation de métastases (Fang *et al.*, 2001; Foster, 2009; Gomez-Cambronero, 2014; Peng et Frohman, 2012).

Dans une étude récente, une diminution de la masse de la tumeur primaire et du fardeau métastatique est observée chez les souris ayant reçu une xénogreffe de cellules MDA-MB-231 suite à l'implantation chirurgicale d'une pompe à inhibiteurs ciblant PLD (Henkels *et al.*, 2013). De plus, l'atténuation sélective de *PLD2* dans cette même lignée cellulaire a diminué la prolifération, mais aussi la capacité migratoire et invasive des cellules (Henkels *et al.*, 2013). Puisque l'enzyme PLD2 peut être activé sélectivement par l'AO (Kim, J. H. *et al.*, 1999; Sarri *et al.*, 2003), nous supposons qu'il existe une possible interaction entre *SCD1* et *PLD2*. À l'issue de ce projet, nous proposons *SCD1* comme étant un joueur important dans la progression du CS en lien avec l'activité de l'enzyme PLD2. En utilisant la lignée cellulaire MDA-231-D3H2LN hautement métastatique, nous montrons que l'inhibition combinée de l'expression de *SCD1* et de l'activité de PLD2 réduit fortement la prolifération due à un dérèglement au niveau du cycle cellulaire (Fig. 2; Lalonde *et al.*, 2016). Une étude précédente a montré l'effet délétère d'une perte d'expression de *SCD1* sur la prolifération de cellules d'adénocarcinomes mammaires (Luyimbazi *et al.*, 2010). Une autre étude expose également une réduction de la prolifération cellulaire, cette fois dans le cadre d'une expérience de mutagenèse dirigée contre PLD2 dans les cellules MDA-MB-231 (Chen, Y. *et al.*, 2003). L'effet moindre de l'inhibition individuelle observée lors de nos traitements pourrait être expliqué par une activité basale intrinsèquement plus élevée dans la lignée cellulaire étudiée ici, une hypothèse en accord avec leur potentiel métastatique (Jenkins *et al.*, 2005). Face à des traitements chimiques similaires, des réponses divergentes de cellules cancéreuses ont été observées en fonction leur degré d'agressivité (Chen, A. *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2014). Néanmoins, il a déjà été démontré que *SCD1* et *PLD2* peuvent contrôler la prolifération cellulaire de façon distincte par les voies de signalisations dépendantes de l'AMPKine et de mTOR respectivement (Chen, Y. *et al.*, 2003; Scaglia *et al.*, 2009), expliquant possiblement l'effet additif de leur inhibition conjointe sur ce mécanisme cellulaire tel qu'observé dans nos résultats (Fig. 2; Lalonde *et al.*, 2016).

La migration et l'invasion de la matrice extracellulaire sont des processus clés pour l'initiation des métastases (van Zijl *et al.*, 2011). De récentes recherches incluant certaines effectuées dans notre laboratoire, ont démontré l'influence de *SCD1* sur la TEM et la migration de cellules de CS, des procédés fortement associés au processus métastatique (Angelucci *et al.*, 2015; Mauvoisin *et al.*, 2013). Une nouvelle étude a démontré l'impact de l'abrogation de *PLD2* sur la mobilité de cellules de CS métastatiques en diminuant fortement leur migration *in vitro* et le nombre de lésions métastatiques suite à des xénogreffes chez la souris (Henkels *et al.*, 2013). Dans la présente étude, nous montrons que le traitement avec l'inhibiteur de *PLD2* combiné avec un siRNA contre *SCD1* diminue fortement le pouvoir de cicatrisation des cellules (Fig. 3 A-C; Lalonde *et al.*, 2016). Puisque le test utilisé pour mesurer le pouvoir de cicatrisation n'exclut pas la prolifération, nous avons soumis les cellules à des essais de migration au travers des membranes « transwell » sous des conditions identiques (Justus *et al.*, 2014). De manière intéressante, l'atténuation de l'expression de *SCD1* et de l'activité de *PLD2* diminue la migration cellulaire d'autant plus lorsque les traitements sont combinés (Fig. 3 D et E; Lalonde *et al.*, 2016). Plusieurs éléments tirés de publications antérieures relatent des observations similaires. D'une part, une surproduction de phospholipides mono insaturés par les enzymes désaturases altère la composition lipidique de la membrane cellulaire en augmentant sa fluidité (Spector et Yorek, 1985). Les cellules cancéreuses qui possèdent une forte fluidité membranaire montrent un potentiel métastatique accru (Barz *et al.*, 1985; Taraboletti *et al.*, 1989). De récentes percées scientifiques relatent le pouvoir de *SCD1* à augmenter la migration de cellules de CS par son habileté à réguler la fluidité membranaire (Angelucci *et al.*, 2015). D'autre part, la voie mTOR est capable d'influencer le processus de migration cellulaire par l'intermédiaire de l'activité enzymatique de *PLD* (Zheng *et al.*, 2006). Somme toute, nous proposons que la modulation de l'expression de *SCD1* et de l'activité de *PLD2* semble altérer la migration des cellules MDA-231-D3H2LN par l'intermédiaire de divers mécanismes,

d'où l'observation d'un effet supérieur lors du traitement combiné. De surcroît, les conséquences de ces traitements sont d'autant plus apparentes lorsque les cellules sont sujettes à des essais d'invasion de matrice extracellulaire. En effet, l'ajout d'un siRNA contre *SCD1* et d'un inhibiteur de *PLD2* réduit de façon très importante la capacité des cellules de CS dégrader le Matrigel recouvrant les membranes « transwell » (Fig. 3F; Lalonde *et al.*, 2016). Le remodelage de la matrice extracellulaire peut être influencé par l'induction de la voie mTOR par l'AP produit par *PLD2* (Lee *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2006). Par conséquent, nous pensons qu'il est possible de réduire la mobilité des cellules cancéreuses, un processus clé lors du développement métastatique, en ciblant plusieurs voies impliquées dans la régulation de ce mécanisme cellulaire.

Dans une étude précédente, nous avons démontré l'implication de *SCD1* dans l'acquisition de propriétés phénotypiques mésenchymales par l'intermédiaire de la voie β -caténine dans différentes lignées cellulaires de CS (Mauvoisin *et al.*, 2013). Les changements de morphologies des cellules cancéreuses peuvent être associés à leur niveau d'agressivité. Plus précisément, les cellules épithéliales qui subissent une TEM montrent souvent un comportement migratoire de type unicellulaire mésenchymal, un patron associé avec le détachement de la tumeur primaire et une morphologie cellulaire fusiforme (Friedl et Wolf, 2003; Krakhmal *et al.*, 2015). Une étude récente a montré dans différentes lignées cellulaires de sarcomes osseux une corrélation entre le pouvoir métastatique des cellules et certains paramètres morphologiques. Les cellules fortement métastatiques montraient un phénotype fusiforme caractérisé par une apparence plus allongée et moins ronde (Lyons *et al.*, 2016). Les modifications morphologiques que nous observons dans les cellules MDA-231-D3H2LN suite à nos traitements semblent correspondre à ce qui a été publié précédemment. Connaissant leur capacité à subir une TEM par l'entremise de *SCD1*, processus caractérisé par un phénotype mésenchymal, nous supposons que l'inhibition de l'expression de *SCD1* et de l'activité de *PLD2* atténue le potentiel

métastatique en modifiant leur morphologie, résultant en des cellules moins allongées, plus rondes (Fig. 4; Lalonde *et al.*, 2016) et des altérations au niveau de leur cytosquelette (Fig. S1; Lalonde *et al.*, 2016). La modification de la fluidité membranaire par *SCD1* (Angelucci *et al.*, 2012; Spector et Yorek, 1985) et la régulation du cytosquelette par l'AP (Ha et Exton, 1993) sont des phénomènes connus qui pourraient expliquer les modifications morphologiques induites par nos traitements. La plasticité de la morphologie cellulaire et l'invasion tissulaire sont des critères étroitement associés présentés par les cellules métastatiques (Friedl et Alexander, 2011). Bref, les résultats de notre étude pointent vers l'implication de *SCD1* et de *PLD2* en tant qu'éléments modulateurs de la morphologie cellulaire, où les cellules de CS métastatiques perdent leurs propriétés mésenchymales suite à la neutralisation de ces deux enzymes.

Malgré l'absence de résultats concernant l'effet de l'atténuation de l'expression de *SCD1* sur la biosynthèse d'AGMI dans notre étude, nous pensons que le traitement avec le siRNA contre *SCD1* est capable de réduire la production d'AO dans les cellules de MDA-231-D3H2LN. En effet, même l'inhibition partielle de l'expression de *SCD1* dans la lignée A549 d'adénocarcinome pulmonaire a diminué de façon significative la synthèse *de novo* d'OA d'environ 20% (Scaglia et Igal, 2008). L'action potentialisatrice de l'AO sur l'activité enzymatique de *PLD2* est suspecte de la possible influence de *SCD1* sur la production d'AP par *PLD2* (Kim, J. H. *et al.*, 1999; Sarri *et al.*, 2003). En omettant la mesure des taux d'AP, nous avons pu nous concentrer sur l'effet de l'atténuation de l'expression de *SCD1* et de l'activité de *PLD2* sur les effecteurs de mTOR, une voie de signalisation fortement régulée par la production d'AP (Chen, Y. *et al.*, 2003; Foster, 2009). Nos résultats montrent que l'inhibition conjointe de l'expression de *SCD1* et de l'activité de *PLD2* diminue l'activation de la voie de signalisation mTOR, suggérant l'implication de ces deux protéines dans la régulation de cette voie (Fig. 5B et C; Lalonde *et al.*, 2016). Nous croyons que la signalisation mTOR au sein des cellules MDA-231-D3H2LN est

naturellement suractivée tel qu'observée dans la lignée 1833, un variant de la lignée parentale MDA-MB-231 isolé à partir de métastases osseuses. Wander et ses collaborateurs ont observé que l'atténuation du signal basal intrinsèquement fort dans les 1833 induit une diminution relative de la migration et de l'invasion encore plus élevée dans ces cellules par rapport à la lignée parentale 231 (Wander *et al.*, 2013). De plus, le traitement combinatoire du siSCD1 et de l'inhibiteur de PLD2 a induit une diminution significative des niveaux d'ARNm messager de YB-1 (Fig. S2; Lalonde *et al.*, 2016), un gène cible de la voie mTOR (Lyabin *et al.*, 2012) dans les cellules de CS. La protéine YB-1 est capable d'initier le processus d'EMT (Evdokimova *et al.*, 2009) et est considérée comme un biomarqueur de l'initiation du processus métastatique du CS. Connaissant l'importance de la signalisation mTOR dans l'initiation des métastases (Hsieh *et al.*, 2012; Zhou et Huang, 2011), nos résultats apportent des nouvelles évidences concernant l'implication de *SCD1* et de *PLD2* en tant que modulateur de cette voie de signalisation. Hors du contexte du cancer, l'AO ne semble avoir aucun effet sur mTORC1. L'addition d'AO dans le milieu de culture de trophoblastes n'induit pas la transduction de signal de cette voie (Lager *et al.*, 2013). Or, des cellules issues d'un hépatocarcinome humain sont sensibles à l'AO, montrant un profil d'activation dose-dépendant de la voie mTOR (Arous *et al.*, 2011). À cet égard, nous avons également observé une induction de la phosphorylation de mTOR et de p70S6K1 en stimulant les MDA-231-D3H2LN avec des doses similaires d'AO (Fig. 5E ; Lalonde *et al.*, 2016). L'atténuation totale de cet effet par l'ajout du VU0285655-1 au milieu réactionnel est d'autant plus intéressante, suggérant un rôle pour SCD1 dans l'activation de mTOR qui dépendrait de PLD2 (Fig. 5F ; Lalonde *et al.*, 2016). Cependant, SCD1 semble moduler mTOR par un mécanisme alternatif par le biais de la phosphorylation d'Akt sur le résidu sérine 473 (Fig. 5D ; Lalonde *et al.*, 2016). Une perte de la phosphorylation d'Akt a été précédemment observé suite à l'atténuation de l'expression de *SCD1* dans des cellules A549 (Scaglia et Igal, 2008). Or, la perte de la phosphorylation au niveau de Akt est possiblement due à un phénomène de rétro-activation par SREBP-1 qui est

gouverné par la kinase p70S6K1 de la voie mTOR (Yamauchi *et al.*, 2011). Sachant qu'Akt est capable de réguler plusieurs mécanismes cellulaires impliqués dans la tumorigénèse indépendamment de mTOR, ceci renforce notre hypothèse que les effets promoteur de SCD1 sur la progression du cancer semble provenir de son étendue d'action sur différentes voies de signalisation. Par ailleurs, nous avons observé que le traitement des cellules de CS avec l'inhibiteur de PLD2 diminuait l'expression de *SCD1* lorsqu'évalué par les expériences en immunofluorescence et de Western blots (Fig. 4B et 5A ; Lalonde *et al.*, 2016). Vu l'absence dans la littérature d'un tel effet observé ou de connaissances pouvant l'expliquer, ce résultat nous semble surprenant et devrait être l'objet de futures études plus approfondies. Somme toute, notre étude soulève la possibilité d'une interaction indirecte entre *SCD1* et *PLD2* qui semble influencer des mécanismes cellulaires clés du développement métastatique du CS.

En résumé, la recherche effectuée au cours de ce projet de maîtrise en biologie nous a permis de mieux comprendre certains mécanismes cellulaires impliquant *SCD1* et *PLD2* dans le processus métastatique du CS. Le blocage de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules MDA-231-D3H2LN par l'inhibition simultanée de l'expression de *SCD1* et de l'activité enzymatique de PLD2 semble être expliqué par une altération de l'activation de la voie de signalisation mTOR. Malgré les effets secondaires indésirables induits par l'ablation ou l'inhibition pharmacologique du gène SCD1 (Miyazaki *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2013), nous croyons que de moduler SCD1 au niveau des tissus cancéreux atteints constitue une avenue envisageable pour le traitement du cancer. L'inhibition spécifique de SCD1 et de PLD2 pourrait ainsi réduire l'incidence des métastases chez les patients atteints de CS et ainsi améliorer leur pronostique.

CHAPITRE V

CONCLUSION

La recherche sur le cancer nous permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires complexes qui permettent la survie et la prolifération de la tumeur primaire ainsi qu'à sa capacité à former des métastases. La littérature scientifique pointe vers une implication importante du métabolisme des lipides au niveau des différents processus qui contrôlent la tumorigénèse. Plus précisément, l'activation des voies de biosynthèse *de novo* d'acide gras semble directement associée avec l'apparition des métastases, phénomène responsable de la grande majorité de la mortalité associée aux patients atteints de tumeurs solides. Dans de nombreux types de cancers incluant le CS, on observe une surexpression de SCD1, l'enzyme clé du processus de désaturation des lipides. Des investigations passées effectuées par notre laboratoire ont démontré l'influence de SCD1 dans l'acquisition de propriétés métastatiques dans plusieurs lignées cellulaires de CS. Les études effectuées lors de ce projet de maîtrise ont permis d'approfondir les connaissances concernant le rôle de cette désaturase en lien avec l'enzyme PLD2 sur plusieurs mécanismes cellulaires critiques au développement de métastases. Nous avons démontré que l'inhibition conjointe de l'expression et de SCD1 et de l'activité de PLD2 induit une diminution de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules MDA-231-D3H2LN hautement métastatiques et altère leur morphologie en réduisant leur phénotype mésenchymal. Nous croyons que la modulation de ces processus associés aux métastases est due à l'activation de la voie mTOR. En effet, nos résultats démontrent

une induction de la signalisation mTOR par l'AO qui est dépendante de l'activité PLD2. Ainsi, les résultats de notre projet apportent de nouvelles perspectives dans l'étude de l'impact du métabolisme lipidique dans le cadre du CS.

Nos recherches à venir tenteront de mieux définir l'interaction entre SCD1 et PLD2 en évaluant l'effet de SCD1 sur la production d'AP et la possibilité d'une boucle de rétrocontrôle sur l'expression de SCD1 régulée par PLD2. Malgré les effets secondaires indésirables induits par l'ablation ou l'inhibition pharmacologique du gène SCD1 (Miyazaki *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2013), nous voulons évaluer l'impact d'un traitement à l'huile sterculique, un inhibiteur naturel de SCD1, en présence ou non d'inhibiteurs pharmacologiques de PLD2 sur la formation des lésions métastatiques en utilisant un modèle de xénogreffe de CS chez la souris immunodéficiente. Ces études permettraient d'évaluer le potentiel thérapeutique de SCD1 et de PLD2 dans le cadre d'expériences *in vivo*, une étape clé pour le développement de traitements médicaux.

BIBLIOGRAPHIE

- Agarwal, S., Pappas, L., Neumayer, L., Kokeny, K. et Agarwal, J. (2014). Effect of breast conservation therapy vs mastectomy on disease-specific survival for early-stage breast cancer. *JAMA Surg*, 149(3), 267-274. doi: 10.1001/jamasurg.2013.3049 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24429935>
- Ali, S. et Coombes, R.C. (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*, 2(2), 101-112. doi: 10.1038/nrc721 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12635173>
- Altomare, D.A. et Testa, J.R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, 24(50), 7455-7464. doi: 10.1038/sj.onc.1209085 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288292>
- Angelucci, C., Maulucci, G., Colabianchi, A., Iacopino, F., D'Alessio, A., Maiorana, A., Palmieri, V., Papi, M., De Spirito, M., Di Leone, A., Masetti, R. et Sica, G. (2015). Stearoyl-CoA desaturase 1 and paracrine diffusible signals have a major role in the promotion of breast cancer cell migration induced by cancer-associated fibroblasts. *Br J Cancer*, 112(10), 1675-1686. doi: 10.1038/bjc.2015.135 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25880005>
- Angelucci, C., Maulucci, G., Lama, G., Proietti, G., Colabianchi, A., Papi, M., Maiorana, A., De Spirito, M., Micera, A., Balzamino, O.B., Di Leone, A., Masetti, R. et Sica, G. (2012). Epithelial-stromal interactions in human breast cancer: effects on adhesion, plasma membrane fluidity and migration speed and directness. *PLoS One*, 7(12), e50804. doi: 10.1371/journal.pone.0050804 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251387>

- Arous, C., Naimi, M. et Van Obberghen, E. (2011). Oleate-mediated activation of phospholipase D and mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates proliferation and rapamycin sensitivity of hepatocarcinoma cells. *Diabetologia*, 54(4), 954-964. doi: 10.1007/s00125-010-2032-1 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21240477>
- Baenke, F., Peck, B., Miess, H. et Schulze, A. (2013). Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech*, 6(6), 1353-1363. doi: 10.1242/dmm.011338 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24203995>
- Barkan, D., El Touny, L.H., Michalowski, A.M., Smith, J.A., Chu, I., Davis, A.S., Webster, J.D., Hoover, S., Simpson, R.M., Gauldie, J. et Green, J.E. (2010). Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. *Cancer Res*, 70(14), 5706-5716. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2356 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570886>
- Barz, D., Goppelt, M., Szamel, M., Schirmacher, V. et Resch, K. (1985). Characterization of cellular and extracellular plasma membrane vesicles from a non-metastasizing lymphoma (Eb) and its metastasizing variant (ESb). *Biochim Biophys Acta*, 814(1), 77-84. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3978101>
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C. et Hall, M.N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 10(11), 868-880. doi: 10.1038/nrd3531 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037041>
- Bocca, C., Bozzo, F., Bassignana, A. et Miglietta, A. (2011). Antiproliferative effects of COX-2 inhibitor celecoxib on human breast cancer cell lines. *Mol Cell Biochem*, 350(1-2), 59-70. doi: 10.1007/s11010-010-0682-4 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21140284>
- Briskin, C. et O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(12), a003178. doi: 10.1101/cshperspect.a003178 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739412>

- Bryzgalova, G., Lundholm, L., Portwood, N., Gustafsson, J.A., Khan, A., Efendic, S. et Dahlman-Wright, K. (2008). Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(4), E904-912. doi: 10.1152/ajpendo.90248.2008
Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18697913>
- Cancer, I.A.f.R.o. (2008). *World Cancer Report 2008*. Dans Boyle, P. a. L., B. (dir.). Geneva
- Cancer, I.A.f.R.o. (2014). *World Cancer Report 2014*. Dans Stewart, B. a. W., C. P. (dir.). Lyon
- Caron-Jobin, M., Mauvoisin, D., Michaud, A., Veilleux, A., Noel, S., Fortier, M.P., Julien, P., Tchernof, A. et Mounier, C. (2012). Stearic acid content of abdominal adipose tissues in obese women. *Nutr Diabetes*, 2, e23. doi: 10.1038/nutd.2011.19
Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23154679>
- Castro, L.F., Wilson, J.M., Goncalves, O., Galante-Oliveira, S., Rocha, E. et Cunha, I. (2011). The evolutionary history of the stearyl-CoA desaturase gene family in vertebrates. *BMC Evol Biol*, 11, 132. doi: 10.1186/1471-2148-11-132 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595943>
- Cavallaro, U. et Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(2), 118-132. doi: 10.1038/nrc1276
Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14964308>
- Chajes, V., Hulten, K., Van Kappel, A.L., Winkvist, A., Kaaks, R., Hallmans, G., Lenner, P. et Riboli, E. (1999). Fatty-acid composition in serum phospholipids and risk of breast cancer: an incident case-control study in Sweden. *Int J Cancer*, 83(5), 585-590. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521790>
- Chajes, V., Thiebaut, A.C., Rotival, M., Gauthier, E., Maillard, V., Boutron-Ruault, M.C., Joulin, V., Lenoir, G.M. et Clavel-Chapelon, F. (2008). Association

- between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC Study. *Am J Epidemiol*, 167(11), 1312-1320. doi: 10.1093/aje/kwn069 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390841>
- Chen, A., Wang, D., Liu, X., He, S., Yu, Z. et Wang, J. (2012). Inhibitory effect of BMP-2 on the proliferation of breast cancer cells. *Mol Med Rep*, 6(3), 615-620. doi: 10.3892/mmr.2012.962 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22735990>
- Chen, L., Linden, H.M., Anderson, B.O. et Li, C.I. (2014). Trends in 5-year survival rates among breast cancer patients by hormone receptor status and stage. *Breast Cancer Res Treat*, 147(3), 609-616. doi: 10.1007/s10549-014-3112-6 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25164974>
- Chen, Y., Zheng, Y. et Foster, D.A. (2003). Phospholipase D confers rapamycin resistance in human breast cancer cells. *Oncogene*, 22(25), 3937-3942. doi: 10.1038/sj.onc.1206565 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12813467>
- Chow, A.Y. (2010). Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nature Education* 3(9), 7.
- Chu, K., Miyazaki, M., Man, W.C. et Ntambi, J.M. (2006). Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol*, 26(18), 6786-6798. doi: 10.1128/MCB.00077-06 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943421>
- Clark, A.G. et Vignjevic, D.M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol*, 36, 13-22. doi: 10.1016/j.ceb.2015.06.004 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26183445>

- Cogliano, V.J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L. et Wild, C.P. (2011). Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 103(24), 1827-1839. doi: 10.1093/jnci/djr483 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158127>
- Collins, J.M., Neville, M.J., Hoppa, M.B. et Frayn, K.N. (2010). De novo lipogenesis and stearyl-CoA desaturase are coordinately regulated in the human adipocyte and protect against palmitate-induced cell injury. *J Biol Chem*, 285(9), 6044-6052. doi: 10.1074/jbc.M109.053280 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032470>
- Cooke, T., Reeves, J., Lanigan, A. et Stanton, P. (2001). HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Ann Oncol*, 12 Suppl 1, S23-28. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11521717>
- Dobrzyn, A. et Ntambi, J.M. (2004). The role of stearyl-CoA desaturase in body weight regulation. *Trends Cardiovasc Med*, 14(2), 77-81. doi: 10.1016/j.tcm.2003.12.005 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15030794>
- Edge, S., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L. et Trotti, A. (2011). *AJCC Cancer Staging Handbook: From the AJCC Cancer Staging Manual*. : Springer New York.
- Ellis, C.N. (2010). *Inherited Cancer Syndromes: Current Clinical Management*. : Springer New York.
- Enoch, H.G., Catala, A. et Strittmatter, P. (1976). Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem*, 251(16), 5095-5103. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8453>
- Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., Ruzanov, P., Melnyk, N., Fink, D., Sorokin, A., Ovchinnikov, L.P., Davicioni, E., Triche, T.J. et Sorensen, P.H. (2009). Translational activation of snail1 and other developmentally regulated

transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell*, 15(5), 402-415. doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.017 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19411069>

Ewertz, M., Jensen, M.B., Gunnarsdottir, K.A., Hojris, I., Jakobsen, E.H., Nielsen, D., Stenbygaard, L.E., Tange, U.B. et Cold, S. (2011). Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*, 29(1), 25-31. doi: 10.1200/JCO.2010.29.7614 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115856>

Falvella, F.S., Pascale, R.M., Gariboldi, M., Manenti, G., De Miglio, M.R., Simile, M.M., Dragani, T.A. et Feo, F. (2002). Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) gene overexpression is associated with genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice and rats. *Carcinogenesis*, 23(11), 1933-1936. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419843>

Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. et Chen, J. (2001). Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, 294(5548), 1942-1945. doi: 10.1126/science.1066015 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11729323>

Fernandez, Y., Espana, L., Manas, S., Fabra, A. et Sierra, A. (2000). Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance. *Cell Death Differ*, 7(4), 350-359. doi: 10.1038/sj.cdd.4400662 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773819>

Foster, D.A. (2009). Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1791(9), 949-955. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.02.009 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19264150>

Friedl, P. et Alexander, S. (2011). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*, 147(5), 992-1009. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.016 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22118458>

- Friedl, P. et Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3(5), 362-374. doi: 10.1038/nrc1075
Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724734>
- Fritz, V., Benfodda, Z., Rodier, G., Henriquet, C., Iborra, F., Avances, C., Allory, Y., de la Taille, A., Culine, S., Blancou, H., Cristol, J.P., Michel, F., Sardet, C. et Fajas, L. (2010). Abrogation of de novo lipogenesis by stearyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice. *Mol Cancer Ther*, 9(6), 1740-1754. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1064
Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530718>
- Gens, G.P., Moiseeva, N.I., Stromskaia, T.P., Rybalkina, E., Vaiman, A.V. et Stavrovskaja, A.A. (2010). [Determination of the amount of YB-1 gene mRNA in the breast tumor tissues to predict the course of disease]. *Klin Lab Diagn*(2), 29-32.
Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20397575>
- Gomez-Cambronero, J. (2014). Phospholipase D in cell signaling: from a myriad of cell functions to cancer growth and metastasis. *J Biol Chem*, 289(33), 22557-22566. doi: 10.1074/jbc.R114.574152
Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24990944>
- Gunasinghe, N.P., Wells, A., Thompson, E.W. et Hugo, H.J. (2012). Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4), 469-478. doi: 10.1007/s10555-012-9377-5
Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22729277>
- Guo, S., Wang, Y., Zhou, D. et Li, Z. (2014). Significantly increased monounsaturated lipids relative to polyunsaturated lipids in six types of cancer microenvironment are observed by mass spectrometry imaging. *Sci Rep*, 4, 5959. doi: 10.1038/srep05959
Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25091112>
- Gupta, G.P. et Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.001
Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110329>

- Gyorffy, B., Lanczky, A., Eklund, A.C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q. et Szallasi, Z. (2010). An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat*, 123(3), 725-731. doi: 10.1007/s10549-009-0674-9 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020197>
- Ha, K.S. et Exton, J.H. (1993). Activation of actin polymerization by phosphatidic acid derived from phosphatidylcholine in IIC9 fibroblasts. *J Cell Biol*, 123(6 Pt 2), 1789-1796. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8276897>
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
- Hannan, K.M., Thomas, G. et Pearson, R.B. (2003). Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochem J*, 370(Pt 2), 469-477. doi: 10.1042/BJ20021709 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429015>
- Hatsell, S., Rowlands, T., Hiremath, M. et Cowin, P. (2003). Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 8(2), 145-158. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635791>
- Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., Willbanks, A. et Sarkar, S. (2015). EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med*, 4, 6. doi: 10.1186/s40169-015-0048-3 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25852822>
- Heitman, J., Movva, N.R. et Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253(5022), 905-909. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715094>
- Henkels, K.M., Boivin, G.P., Dudley, E.S., Berberich, S.J. et Gomez-Cambronero, J. (2013). Phospholipase D (PLD) drives cell invasion, tumor growth and

metastasis in a human breast cancer xenograph model. *Oncogene*, 32(49), 5551-5562. doi: 10.1038/onc.2013.207 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23752189>

Holder, A.M., Gonzalez-Angulo, A.M., Chen, H., Akcakanat, A., Do, K.A., Fraser Symmans, W., Pusztai, L., Hortobagyi, G.N., Mills, G.B. et Meric-Bernstam, F. (2013). High stearoyl-CoA desaturase 1 expression is associated with shorter survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 137(1), 319-327. doi: 10.1007/s10549-012-2354-4 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23208590>

Hsieh, A.C., Liu, Y., Edlind, M.P., Ingolia, N.T., Janes, M.R., Sher, A., Shi, E.Y., Stumpf, C.R., Christensen, C., Bonham, M.J., Wang, S., Ren, P., Martin, M., Jessen, K., Feldman, M.E., Weissman, J.S., Shokat, K.M., Rommel, C. et Ruggero, D. (2012). The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature*, 485(7396), 55-61. doi: 10.1038/nature10912 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22367541>

Huang, R.Y., Guilford, P. et Thiery, J.P. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*, 125(Pt 19), 4417-4422. doi: 10.1242/jcs.099697 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23165231>

Hudis, C.A. et Gianni, L. (2011). Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist*, 16 Suppl 1, 1-11. doi: 10.1634/theoncologist.2011-S1-01 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278435>

Ide, Y., Waki, M., Hayasaka, T., Nishio, T., Morita, Y., Tanaka, H., Sasaki, T., Koizumi, K., Matsunuma, R., Hosokawa, Y., Ogura, H., Shiiya, N. et Setou, M. (2013). Human breast cancer tissues contain abundant phosphatidylcholine(36ratio1) with high stearoyl-CoA desaturase-1 expression. *PLoS One*, 8(4), e61204. doi: 10.1371/journal.pone.0061204 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613812>

Jenkins, D.E., Hornig, Y.S., Oei, Y., Dusich, J. et Purchio, T. (2005). Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection

of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res*, 7(4), R444-454. doi: 10.1186/bcr1026 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987449>

Jia, T., Zhang, L., Duan, Y., Zhang, M., Wang, G., Zhang, J. et Zhao, Z. (2014). The differential susceptibilities of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to the cytotoxic effects of curcumin are associated with the PI3K/Akt-SKP2-Cip/Kips pathway. *Cancer Cell Int*, 14(1), 126. doi: 10.1186/s12935-014-0126-4 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530715>

Justus, C.R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M. et Yang, L.V. (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp*(88). doi: 10.3791/51046 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962652>

Kim, J.H., Kim, Y., Lee, S.D., Lopez, I., Arnold, R.S., Lambeth, J.D., Suh, P.G. et Ryu, S.H. (1999). Selective activation of phospholipase D2 by unsaturated fatty acid. *FEBS Lett*, 454(1-2), 42-46. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413092>

Kim, Y.C., Gomez, F.E., Fox, B.G. et Ntambi, J.M. (2000). Differential regulation of the stearoyl-CoA desaturase genes by thiazolidinediones in 3T3-L1 adipocytes. *J Lipid Res*, 41(8), 1310-1316. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10946019>

Krakhmal, N.V., Zavyalova, M.V., Denisov, E.V., Vtorushin, S.V. et Perelmuter, V.M. (2015). Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae*, 7(2), 17-28. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085941>

Kwan, M.L., Kushi, L.H., Weltzien, E., Maring, B., Kutner, S.E., Fulton, R.S., Lee, M.M., Ambrosone, C.B. et Caan, B.J. (2009). Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Res*, 11(3), R31. doi: 10.1186/bcr2261 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19463150>

Lager, S., Gaccioli, F., Ramirez, V.I., Jones, H.N., Jansson, T. et Powell, T.L. (2013). Oleic acid stimulates system A amino acid transport in primary human

trophoblast cells mediated by toll-like receptor 4. *J Lipid Res*, 54(3), 725-733. doi: 10.1194/jlr.M033050 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23275648>

Lamouille, S., Xu, J. et Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3), 178-196. doi: 10.1038/nrm3758 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24556840>

Laplane, M. et Sabatini, D.M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 20), 3589-3594. doi: 10.1242/jcs.051011 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812304>

Laplane, M. et Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500797>

Lee, J.G., Lee, S.H., Park, D.W., Bae, Y.S., Yun, S.S., Kim, J.R. et Baek, S.H. (2007). Phosphatidic acid as a regulator of matrix metalloproteinase-9 expression via the TNF-alpha signaling pathway. *FEBS Lett*, 581(4), 787-793. doi: 10.1016/j.febslet.2007.01.048 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276429>

Li, C.I., Uribe, D.J. et Daling, J.R. (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*, 93(9), 1046-1052. doi: 10.1038/sj.bjc.6602787 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175185>

Lu, Z., Jiang, G., Blume-Jensen, P. et Hunter, T. (2001). Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*, 21(12), 4016-4031. doi: 10.1128/MCB.21.12.4016-4031.2001 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359909>

Luyimbazi, D., Akcakanat, A., McAuliffe, P.F., Zhang, L., Singh, G., Gonzalez-Angulo, A.M., Chen, H., Do, K.A., Zheng, Y., Hung, M.C., Mills, G.B. et

- Meric-Bernstam, F. (2010). Rapamycin regulates stearyl CoA desaturase 1 expression in breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 9(10), 2770-2784. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0980 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876744>
- Lyabin, D.N., Eliseeva, I.A. et Ovchinnikov, L.P. (2012). YB-1 synthesis is regulated by mTOR signaling pathway. *PLoS One*, 7(12), e52527. doi: 10.1371/journal.pone.0052527 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285076>
- Lyons, S.M., Alizadeh, E., Mannheimer, J., Schuamberg, K., Castle, J., Schroder, B., Turk, P., Thamm, D. et Prasad, A. (2016). Changes in cell shape are correlated with metastatic potential in murine and human osteosarcomas. *Biol Open*, 5(3), 289-299. doi: 10.1242/bio.013409 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26873952>
- Ma, X.M. et Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(5), 307-318. doi: 10.1038/nrm2672 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339977>
- Macias, H. et Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 1(4), 533-557. doi: 10.1002/wdev.35 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844349>
- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H. et Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*, 10(10), 955-960. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057215>
- Mashima, T., Seimiya, H. et Tsuruo, T. (2009). De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer*, 100(9), 1369-1372. doi: 10.1038/sj.bjc.6605007 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19352381>
- Mason, P., Liang, B., Li, L., Fremgen, T., Murphy, E., Quinn, A., Madden, S.L., Biemann, H.P., Wang, B., Cohen, A., Komarnitsky, S., Jancsics, K., Hirth, B.,

- Cooper, C.G., Lee, E., Wilson, S., Krumbholz, R., Schmid, S., Xiang, Y., Booker, M., Lillie, J. et Carter, K. (2012). SCD1 inhibition causes cancer cell death by depleting mono-unsaturated fatty acids. *PLoS One*, 7(3), e33823. doi: 10.1371/journal.pone.0033823 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22457791>
- Mauvoisin, D., Charfi, C., Lounis, A.M., Rassart, E. et Mounier, C. (2013). Decreasing stearoyl-CoA desaturase-1 expression inhibits beta-catenin signaling in breast cancer cells. *Cancer Sci*, 104(1), 36-42. doi: 10.1111/cas.12032 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23013158>
- Mayer, C. et Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene*, 25(48), 6384-6391. doi: 10.1038/sj.onc.1209883 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17041624>
- Medes, G., Thomas, A. et Weinhouse, S. (1953). Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res*, 13(1), 27-29. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13032945>
- Mitri, Z., Constantine, T. et O'Regan, R. (2012). The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract*, 2012, 743193. doi: 10.1155/2012/743193 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23320171>
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W.C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H.J. et Ntambi, J.M. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 279(24), 25164-25171. doi: 10.1074/jbc.M402781200 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066988>
- Miyazaki, M., Man, W.C. et Ntambi, J.M. (2001). Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *J Nutr*, 131(9), 2260-2268. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533264>

- Mounier, C., Bouraoui, L. et Rassart, E. (2014). Lipogenesis in cancer progression (review). *Int J Oncol*, 45(2), 485-492. doi: 10.3892/ijo.2014.2441 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24827738>
- Mziaut, H., Korza, G. et Ozols, J. (2000). The N terminus of microsomal delta 9 stearoyl-CoA desaturase contains the sequence determinant for its rapid degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(16), 8883-8888. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922050>
- Nguyen, D.X. et Massague, J. (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*, 8(5), 341-352. doi: 10.1038/nrg2101 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17440531>
- Nierodzik, M.L. et Karparkin, S. (2006). Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*, 10(5), 355-362. doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.002 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17097558>
- Nieva, C., Marro, M., Santana-Codina, N., Rao, S., Petrov, D. et Sierra, A. (2012). The lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: towards a stratification of malignancy. *PLoS One*, 7(10), e46456. doi: 10.1371/journal.pone.0046456 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23082122>
- Ntambi, J.M., Miyazaki, M., Stoeckl, J.P., Lan, H., Kendziora, C.M., Yandell, B.S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J.M. et Attie, A.D. (2002). Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(17), 11482-11486. doi: 10.1073/pnas.132384699 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12177411>
- Oudard, S., Medioni, J., Ayllon, J., Barrascourt, E., Elaidi, R.T., Balcaceres, J. et Scotte, F. (2009). Everolimus (RAD001): an mTOR inhibitor for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 9(6), 705-717. doi: 10.1586/era.09.27 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19496707>

- Paton, C.M. et Ntambi, J.M. (2009). Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(1), E28-37. doi: 10.1152/ajpendo.90897.2008 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066317>
- Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donze, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C., Jr. et Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*, 371(6500), 762-767. doi: 10.1038/371762a0 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7935836>
- Peck, B., Schug, Z.T., Zhang, Q., Dankworth, B., Jones, D.T., Smethurst, E., Patel, R., Mason, S., Jiang, M., Saunders, R., Howell, M., Mitter, R., Spencer-Dene, B., Stamp, G., McGarry, L., James, D., Shanks, E., Aboagye, E.O., Critchlow, S.E., Leung, H.Y., Harris, A.L., Wakelam, M.J., Gottlieb, E. et Schulze, A. (2016). Inhibition of fatty acid desaturation is detrimental to cancer cell survival in metabolically compromised environments. *Cancer Metab*, 4, 6. doi: 10.1186/s40170-016-0146-8 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27042297>
- Pecorino, L. (2012). *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. : OUP Oxford.
- Peinado, H., Portillo, F. et Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*, 48(5-6), 365-375. doi: 10.1387/ijdb.041794hp Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15349812>
- Peng, X. et Frohman, M.A. (2012). Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles. *Acta Physiol (Oxf)*, 204(2), 219-226. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02298.x Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21447092>
- Peter, A., Weigert, C., Staiger, H., Machicao, F., Schick, F., Machann, J., Stefan, N., Thamer, C., Haring, H.U. et Schleicher, E. (2009). Individual stearoyl-coa desaturase 1 expression modulates endoplasmic reticulum stress and

inflammation in human myotubes and is associated with skeletal muscle lipid storage and insulin sensitivity in vivo. *Diabetes*, 58(8), 1757-1765. doi: 10.2337/db09-0188 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478146>

Petrek, J.A., Hudgins, L.C., Ho, M., Bajorunas, D.R. et Hirsch, J. (1997). Fatty acid composition of adipose tissue, an indication of dietary fatty acids, and breast cancer prognosis. *J Clin Oncol*, 15(4), 1377-1384. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9193329>

Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S. et Ellis, I.O. (2010). Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 120(2), 293-308. doi: 10.1007/s10549-010-0746-x Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107892>

Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell*, 145(7), 1012-1022. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.010 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703446>

Rios-Esteves, J. et Resh, M.D. (2013). Stearoyl CoA desaturase is required to produce active, lipid-modified Wnt proteins. *Cell Rep*, 4(6), 1072-1081. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.027 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055053>

Rivera, V.M., Squillace, R.M., Miller, D., Berk, L., Wardwell, S.D., Ning, Y., Pollock, R., Narasimhan, N.I., Iuliucci, J.D., Wang, F. et Clackson, T. (2011). Ridaforolimus (AP23573; MK-8669), a potent mTOR inhibitor, has broad antitumor activity and can be optimally administered using intermittent dosing regimens. *Mol Cancer Ther*, 10(6), 1059-1071. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0792 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21482695>

Roberts, R., Hodson, L., Dennis, A.L., Neville, M.J., Humphreys, S.M., Harnden, K.E., Micklem, K.J. et Frayn, K.N. (2009). Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia*, 52(5), 882-890. doi: 10.1007/s00125-009-1300-4 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19252892>

- Rodriguez, L.G., Wu, X. et Guan, J.L. (2005). Wound-healing assay. *Methods Mol Biol*, 294, 23-29. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576902>
- Rosenthal, D.T., Iyer, H., Escudero, S., Bao, L., Wu, Z., Ventura, A.C., Kleer, C.G., Arruda, E.M., Garikipati, K. et Merajver, S.D. (2011). p38gamma promotes breast cancer cell motility and metastasis through regulation of RhoC GTPase, cytoskeletal architecture, and a novel leading edge behavior. *Cancer Res*, 71(20), 6338-6349. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1291 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21862636>
- Sabel, M.S. (2009). *Essentials of Breast Surgery*. : Mosby/Elsevier.
- Sarri, E., Pardo, R., Fensome-Green, A. et Cockcroft, S. (2003). Endogenous phospholipase D2 localizes to the plasma membrane of RBL-2H3 mast cells and can be distinguished from ADP ribosylation factor-stimulated phospholipase D1 activity by its specific sensitivity to oleic acid. *Biochem J*, 369(Pt 2), 319-329. doi: 10.1042/BJ20021347 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12374567>
- Savagner, P. (2007). *Rise and Fall of Epithelial Phenotype: Concepts of Epithelial-Mesenchymal Transition*. : Springer London, Limited.
- Scaglia, N., Caviglia, J.M. et Igal, R.A. (2005). High stearoyl-CoA desaturase protein and activity levels in simian virus 40 transformed-human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1687(1-3), 141-151. doi: 10.1016/j.bbali.2004.11.015 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15708362>
- Scaglia, N., Chisholm, J.W. et Igal, R.A. (2009). Inhibition of stearoylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK. *PLoS One*, 4(8), e6812. doi: 10.1371/journal.pone.0006812 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19710915>

- Scaglia, N. et Igal, R.A. (2008). Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. *Int J Oncol*, 33(4), 839-850. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18813799>
- Scott, S.A., Selvy, P.E., Buck, J.R., Cho, H.P., Criswell, T.L., Thomas, A.L., Armstrong, M.D., Arteaga, C.L., Lindsley, C.W. et Brown, H.A. (2009). Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness. *Nat Chem Biol*, 5(2), 108-117. doi: 10.1038/nchembio.140 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136975>
- Sestak, I., Distler, W., Forbes, J.F., Dowsett, M., Howell, A. et Cuzick, J. (2010). Effect of body mass index on recurrences in tamoxifen and anastrozole treated women: an exploratory analysis from the ATAC trial. *J Clin Oncol*, 28(21), 3411-3415. doi: 10.1200/JCO.2009.27.2021 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547990>
- Shannon, J., King, I.B., Moshofsky, R., Lampe, J.W., Gao, D.L., Ray, R.M. et Thomas, D.B. (2007). Erythrocyte fatty acids and breast cancer risk: a case-control study in Shanghai, China. *Am J Clin Nutr*, 85(4), 1090-1097. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17413110>
- Sheikh, A., Niazi, A.K., Ahmed, M.Z., Iqbal, B., Anwer, S.M. et Khan, H.H. (2014). The role of Wnt signaling pathway in carcinogenesis and implications for anticancer therapeutics. *Hered Cancer Clin Pract*, 12(1), 13. doi: 10.1186/1897-4287-12-13 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24817919>
- Simonsen, N.R., Fernandez-Crehuet Navajas, J., Martin-Moreno, J.M., Strain, J.J., Huttunen, J.K., Martin, B.C., Thamm, M., Kardinaal, A.F., van't Veer, P., Kok, F.J. et Kohlmeier, L. (1998). Tissue stores of individual monounsaturated fatty acids and breast cancer: the EURAMIC study. European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer. *Am J Clin Nutr*, 68(1), 134-141. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665107>

- Singletary, S.E. (2003). Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg*, 237(4), 474-482. doi: 10.1097/01.SLA.0000059969.64262.87 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12677142>
- Sliva, D., Mason, R., Xiao, H. et English, D. (2000). Enhancement of the migration of metastatic human breast cancer cells by phosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 268(2), 471-479. doi: 10.1006/bbrc.2000.2111 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679229>
- Society, A.C. (2015). *Cancer Facts & Figures 2015*. Dans Society, A. C. (dir.). (Cancer Facts & Figures). Atlanta
- Sounni, N.E., Cimino, J., Blacher, S., Primac, I., Truong, A., Mazzucchelli, G., Paye, A., Calligaris, D., Debois, D., De Tullio, P., Mari, B., De Pauw, E. et Noel, A. (2014). Blocking lipid synthesis overcomes tumor regrowth and metastasis after antiangiogenic therapy withdrawal. *Cell Metab*, 20(2), 280-294. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.022 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25017943>
- Spector, A.A. et Yorek, M.A. (1985). Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res*, 26(9), 1015-1035. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3906008>
- Statistics, C.C.S.s.A.C.o.C. (2015). *Canadian Cancer Statistics 2015*. Toronto, ON: Canadian Cancer Society.
- Steeg, P.S. et Theodorescu, D. (2008). Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 5(4), 206-219. doi: 10.1038/ncponc1066 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18253104>
- Stegeman, H., Kaanders, J.H., Wheeler, D.L., van der Kogel, A.J., Verheijen, M.M., Waaijer, S.J., Iida, M., Grenman, R., Span, P.N. et Bussink, J. (2012). Activation of AKT by hypoxia: a potential target for hypoxic tumors of the head and neck. *BMC Cancer*, 12, 463. doi: 10.1186/1471-2407-12-463 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046567>

- Sung, T.C., Roper, R.L., Zhang, Y., Rudge, S.A., Temel, R., Hammond, S.M., Morris, A.J., Moss, B., Engebrecht, J. et Frohman, M.A. (1997). Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J*, 16(15), 4519-4530. doi: 10.1093/emboj/16.15.4519 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9303296>
- Swinnen, J.V., Brusselmans, K. et Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9(4), 358-365. doi: 10.1097/01.mco.0000232894.28674.30 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778563>
- Taraboletti, G., Perin, L., Bottazzi, B., Mantovani, A., Giavazzi, R. et Salmona, M. (1989). Membrane fluidity affects tumor-cell motility, invasion and lung-colonizing potential. *Int J Cancer*, 44(4), 707-713. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2793242>
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2(6), 442-454. doi: 10.1038/nrc822 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12189386>
- Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J. et Cossins, A.R. (1996). Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science*, 271(5250), 815-818. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8629000>
- Uchida, N., Okamura, S., Nagamachi, Y. et Yamashita, S. (1997). Increased phospholipase D activity in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 123(5), 280-285. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9201251>
- van Roy, F. et Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 65(23), 3756-3788. doi: 10.1007/s00018-008-8281-1 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18726070>
- van Zijl, F., Krupitza, G. et Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res*, 728(1-2), 23-34. doi:

10.1016/j.mrrev.2011.05.002 Récupéré de
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605699>

Vezina, C., Kudelski, A. et Sehgal, S.N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 28(10), 721-726. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1102508>

von Roemeling, C.A., Marlow, L.A., Wei, J.J., Cooper, S.J., Caulfield, T.R., Wu, K., Tan, W.W., Tun, H.W. et Copland, J.A. (2013). Stearoyl-CoA desaturase 1 is a novel molecular therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 19(9), 2368-2380. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3249 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23633458>

Vona-Davis, L., Rose, D.P., Hazard, H., Howard-McNatt, M., Adkins, F., Partin, J. et Hobbs, G. (2008). Triple-negative breast cancer and obesity in a rural Appalachian population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(12), 3319-3324. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0544 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064545>

Voulgari, A. et Pintzas, A. (2009). Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*, 1796(2), 75-90. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.03.002 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19306912>

Wander, S.A., Zhao, D., Besser, A.H., Hong, F., Wei, J., Ince, T.A., Milikowski, C., Bishopric, N.H., Minn, A.J., Creighton, C.J. et Slingerland, J.M. (2013). PI3K/mTOR inhibition can impair tumor invasion and metastasis in vivo despite a lack of antiproliferative action in vitro: implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res Treat*, 138(2), 369-381. doi: 10.1007/s10549-012-2389-6 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23430223>

Warburg, O., Wind, F. et Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol*, 8(6), 519-530. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19872213>

- Watson, C.J. et Khaled, W.T. (2008). Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development*, 135(6), 995-1003. doi: 10.1242/dev.005439 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18296651>
- Weigelt, B., Peterse, J.L. et van 't Veer, L.J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*, 5(8), 591-602. doi: 10.1038/nrc1670 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056258>
- Xie, Z., Ho, W.T. et Exton, J.H. (2002). Functional implications of post-translational modifications of phospholipases D1 and D2. *Biochim Biophys Acta*, 1580(1), 9-21. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923096>
- Yahagi, N., Shimano, H., Hasegawa, K., Ohashi, K., Matsuzaka, T., Najima, Y., Sekiya, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Nagai, R., Ishibashi, S., Kadowaki, T., Makuuchi, M., Ohnishi, S., Osuga, J. et Yamada, N. (2005). Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer*, 41(9), 1316-1322. doi: 10.1016/j.ejca.2004.12.037 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15869874>
- Yamauchi, Y., Furukawa, K., Hamamura, K. et Furukawa, K. (2011). Positive feedback loop between PI3K-Akt-mTORC1 signaling and the lipogenic pathway boosts Akt signaling: induction of the lipogenic pathway by a melanoma antigen. *Cancer Res*, 71(14), 4989-4997. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4108 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21632551>
- Yan, Y. et Lackner, M.R. (2012). FOXO3a and beta-catenin co-localization: double trouble in colon cancer? *Nat Med*, 18(6), 854-856. doi: 10.1038/nm.2799 Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22673992>
- Yasuda, M., Tanaka, Y., Kume, S., Morita, Y., Chin-Kanasaki, M., Araki, H., Isshiki, K., Araki, S., Koya, D., Haneda, M., Kashiwagi, A., Maegawa, H. et Uzu, T. (2014). Fatty acids are novel nutrient factors to regulate mTORC1 lysosomal localization and apoptosis in podocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1842(7),

1097-1108. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.04.001 Récupéré de
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726883>

Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3), 497-503. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10688870>

Yonezawa, T., Haga, S., Kobayashi, Y., Katoh, K. et Obara, Y. (2008). Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 367(4), 729-735. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.12.190 Récupéré de
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191634>

Zhang, Z., Sun, S., Kodumuru, V., Hou, D., Liu, S., Chakka, N., Sviridov, S., Chowdhury, S., McLaren, D.G., Ratkay, L.G., Khakh, K., Cheng, X., Gschwend, H.W., Kamboj, R., Fu, J. et Winther, M.D. (2013). Discovery of piperazin-1-ylpyridazine-based potent and selective stearyl-CoA desaturase-1 inhibitors for the treatment of obesity and metabolic syndrome. *J Med Chem*, 56(2), 568-583. doi: 10.1021/jm301661h Récupéré de
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245208>

Zheng, Y., Rodrik, V., Toschi, A., Shi, M., Hui, L., Shen, Y. et Foster, D.A. (2006). Phospholipase D couples survival and migration signals in stress response of human cancer cells. *J Biol Chem*, 281(23), 15862-15868. doi: 10.1074/jbc.M600660200 Récupéré de
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595654>

Zhou, H. et Huang, S. (2011). Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci*, 12(1), 30-42. Récupéré de
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21190521>

Zhu, Z.R., Agren, J., Mannisto, S., Pietinen, P., Eskelinen, M., Syrjanen, K. et Uusitupa, M. (1995). Fatty acid composition of breast adipose tissue in breast cancer patients and in patients with benign breast disease. *Nutr Cancer*, 24(2), 151-160. doi: 10.1080/01635589509514403 Récupéré de
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8584451>

Zureik, M., Ducimetiere, P., Warnet, J.M. et Orssaud, G. (1995). Fatty acid proportions in cholesterol esters and risk of premature death from cancer in middle aged French men. *BMJ*, 311(7015), 1251-1254. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7496232>